GRIGORE MIHĂESCU

MICROBIOLOGIE GENERALĂ ŞI VIROLOGIE

Editura Universităţii din Bucureşti
– 2000 –

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

60 22717

Prof. dr. GRIGORE MIHĂESCU

MICROBIOLOGIE GENERALĂ ŞI VIROLOGIE

EDITURA UNIVERSITĂŢII DIN BUCUREŞTI
2000

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
BUCUREŞTI
COTA IV 516792

Referenţi ştiinţifici: Prof. Univ. dr. N. TOMA
Conf. Univ. dr. TATIANA VASSU

RMF 39/01

B.C.U. Bucureşti
C20010595

© Editura Universităţii din Bucureşti
Şos. Panduri, 90-92, Bucureşti – 76235; Telefon/Fax 410.23.84
E-mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Tehnoredactare computerizată: FLORIAN MIHALCEA

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale
MIHĂESCU, GRIGORE
Microbiologie generală şi virologie / Grigore Mihăescu, Bucureşti: Editura Universităţii din Bucureşti, 2000
582 p; 28 cm
Bibliogr.
ISBN: 973-575-455-X

578

579

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CUPRINS

Cuvânt înainte 13
Prefaţă 15
Introducere 17
Evoluţia microbiologiei ca ştiinţă 18
Diviziunile microbiologiei 19
Importanţa practică a microorganismelor 19
Poziţia microorganismelor în sistemele de clasificare a lumii vii 21
Clasificarea lumii vii în trei domenii 22
Caracteristicile distinctive ale organismelor celor trei domenii 24
Tipuri morfologice de bacterii 27

Capitolul I. **STRUCTURA şi FUNCŢIILE CELULEI BACTERIENE**
Peretele celular 31
Structura moleculară a peretelui celular la bacteriile Gram pozitive 31
Peretele celular la bacteriile Gram negative 35
Peretele celular acido-rezistent al micobacteriilor 38
Funcţiile peretelui celular 39
Protoplaştii 40
Spaţiul periplasmic 41
Membrana plasmatică 41
Membrana archaebacteriilor 45
Funcţiile membranei plasmatice 46
Difuzia şi transportul moleculelor în celulă 46
Difuzia pasivă 47
Sisteme de transfer cu molecule purtător 47
Difuzia facilitată 47
Translocaţia de grup 49
Transportul activ 50
Sisteme celulare de transport ionic 51
Aparatul fotosintetic 52
Mezosomul 52
Citoplasma 52
Echilibrul osmotic al celulei 54
Echilibrul osmotic la bacteriile halofile 55
Ribosomii 56
Rolul ribosomilor în sinteza proteică 5
Secreţia proteinelor extracelulare la bacterii 59
Nucleoidul bacterian 61
Organizarea fizică a cromosomului 61
Replicarea ADN bacterian 63
Sporul 65
Structura internă a endosporului 67
Particularităţile biochimice ale sporului 68
Semnificaţia biologică a procesului de sporogeneză 69
Formarea sporilor de multiplicare la actinomicete 69

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Vacuolele cu gaz (aerosomii) 69
Incluziile 70
Glicocalixul 72
Natura chimică a materialului capsular 72
Sinteza exopolizaharidelor 73
Glicocalixul comportamental 74
Flagelul 75
Structura flagelului 76
Motilitatea şi chimiotaxia 77
Fimbriile 80
Pilii 81

Capitolul II. **CREŞTEREA SI MULTIPLICAREA BACTERIILOR**
Creşterea celulei bacteriene 82
Multiplicarea prin diviziune 83
Diviziunea asimetrică 84
Reglarea procesului de diviziune 85
Dinamica unei culturi bacteriene staţionare 86
Culturi continui 89
Creşterea diauxică 90

Capitolul III. **NUTRIŢIA BACTERIANĂ**
Tipuri de nutriţie a microorganismelor 92
Nutriţia autotrofă 93
Nutriţia fotolitotrofă. Fotosinteza 93
Fotosinteza bacteriană 96
Nutriţia chimiolitotrofă 98
Bacteriile care oxidează H_2 (Hidrogen-bacteriile) 98
Bacteriile metanogene 99
Importanţa ecologică a bacteriilor metanogene 100
Bacteriile care oxidează sulful şi compuşii săi 100
Bacteriile care oxidează compuşii Fe 101
Bacteriile care oxidează amoniacul şi nitritul 101
Fixarea CO_2 la bacteriile chimiolitotrofe. Ciclul Calvin 102
Nutriţia organică a bacteriilor chimiolitotrofe 104
Nutriţia chimioorganotrofă (heterotrofă) 104
Factorii de creştere 105

Capitolul IV. **METABOLISMUL BACTERIAN**
Particularităţile generale ale metabolismului bacterian 108
Metabolismul energetic bacterian 110
Tipuri de metabolism energetic în funcţie de acceptorul final de electroni 110
Reacţii de oxidare a substratului energetic 111
Potenţialul redox si generarea energiei 112
Reducerea acceptorului final de electroni 113
Respiraţia aerobă bacteriană 114
Componentele catenei respiratorii bacteriene 115
Ciclul Krebs 117
Mecanisme de conservare a energiei 118
Sinteza ATP dependentă de gradientul protonic 118
Mecanisme moleculare protectoare care permit respiraţia aerobă 119
Respiraţia anaerobă 121
Respiraţia nitraţilor 122
Reducerea asimilatorie a nitraţilor 123
Respiraţia sulfatului 124
Respiraţia fumaratului 125
Respiraţia carbonatului(Reducerea respiratorie a CO_2) 125
Fermentaţia 125
Fermentaţia glucidelor 126
Fermentaţia lactică 128

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fermentaţia alcoolică produsă de levuri 131
Fermentaţia alcoolică bacteriană 132
Fermentaţiile acide 133
Fermentaţia butirică 135
Fermentaţia butanediolului 136
Fermentaţia acidului propionic 137
Catabolismul lipidelor 138
Catabolizarea compuşilor organici cu azot 139
Catabolismul compuşilor aromatici 141
Catabolismul compuşilor cu un atom de C. Bacterii metilotrofe si metanotrofe 142
Catabolismul alcoolului etilic 143
Reacţiile de anabolism 144
Căile anaplerotice. Calea glioxilatului

Capitolul V. **INFLUENŢA FACTORILOR FIZICI ŞI CHIMICI ASUPRA MICROORGANISMELOR**
Influenţa factorilor fizici asupra microorganismelor
Temperatura 147
Microorganisme criofile 148
Microorganisme mezofile 149
Microorganisme termofile 150
Microorganisme hipertermofile 151
Sterilizarea 151
Principiile sterilizării termice şi dezinfecţiei 152
Presiunea osmotică 152
Presiunea hidrostatică 153
Energia radiantă 154
Acţiunea laserului 157
Acţiunea ultrasunetelor 157
Acţiunea substanţelor chimice asupra microorganismelor 157
Mecanismele de acţiune a substanţelor antibacteriene 158
Substanţe antibacteriene active prin modificări de permeabilitate 159
Substanţe care acţionează prin denaturarea proteinelor 160
Evaluarea potenţialului antibacterian al agenţilor chimici 161
Coeficientul fenolic 162
Substanţe care acţionează prin interferenţă cu grupările active ale proteinelor-enzime 163
Agenţii chimioterapeutici 166
Agenţi chimioterapeutici activi prin inhibiţie competitivă 167
Alţi agenţi chimioterapeutici de sinteză 169
Antibioticele 171
Clasificarea antibioticelor in funcţie de structura chimică 172
Mecanismele de acţiune a antibioticelor 177
Antibiotice care inhibă sinteza peretelui celular 177
Antibiotice antiribosomale 178
Antibiotice care modifică permeabilitatea membranei plasmatice 180
Antibiotice care interferă cu funcţiile acizilor nucleici 180

Capitolul VI. **VIROLOGIE**
Modelul general de structură a virionului 182
Capsida virală 183
Învelişul extern 184
Genomul viral. Organizare fizică 185
Modalităţi particulare de codificare a informaţiei genetice 188
Genomuri virale ARN segmentate (divizate, multipartite) 190
Semnificaţia biologică a genomului viral 190
Infecţiozitatea acizilor nucleici virali 191
Definirea conceptului modern de virus 191
Simetria virusurilor 193
Simetria helicală 194
Simetria icozaedrică
Probleme legate de modul de construcţie a virionilor icozaedrici 195
Simetria complexă (binară) 198

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Multiplicarea (replicarea) virusurilor 198
Iniţierea procesului infecţios 199
Pătrunderea virusului in celulă (infecţia propriu-zisă) 200
Biosinteza proteinelor timpurii 203
Sinteza ARNm viral 204
Sinteza ARNm la dezoxiribovirusuri 205
Sinteza ARNm la ribovirusuri 206
Replicarea genomului viral 208
Replicarea genomului ADN 208
Replicarea genomului viral ARN 214
Biosinteza proteinelor tardive 218
Asamblarea (morfogeneza) virală 219
Structura si replicarea virusurilor cu simetrie helicală 223
Orthomixovirusuri 223
Glicoproteinele de înveliş 224
Alte proteine virale 226
Transcrierea 227
Asamblarea virionilor 228
Reasortarea genetică 229
Paramixovirusuri 230
Transcrierea ARN 232
Replicarea ARN 232
Rhabdovirusuri 233
Structura si replicarea virusurilor cu simetrie icozaedrică 236
Picornavirusuri 236
Ciclul de multiplicare 236
Adenovirusuri 238
Ciclul de multiplicare 240
Herpesvirusuri 241
Ciclul de multiplicare 244
Hepadnavirusuri 246
Ciclul de multiplicare 249
Structura si replicarea virusurilor cu organizare complexă 252
Poxvirusuri 252
Ciclul de multiplicare 253
Structura şi replicarea retravirusurilor 255
Oncornavirusuri 256
Organizarea genomului 258
Ciclul de multiplicare 260
Virusul imunodeficientei umane dobandite (HIV) 264
Tipuri de relaţii virus-celulă gazdă 266
Patologia celulelor infectate cu virusuri 268
Mecanismele moleculare ale interacţiunii virus-celulă. Efectul citopatic (ECP) 269
1. Modificări metabolice 269
Modificări ale metabolismului ADN 269
Modificări ale metabolismului ARN 270
Modificări ale metabolismului proteinelor 271
2. Alterarea funcţiilor membranei celulare 271
3. Modificări ale citoscheletului 272
4. Apariţia corpilor de incluziune 272
Tipuri de relaţii între virusuri şi organisme 274
Tropismul viral 274
Tipuri de infecţii in vivo 275
Persistenţa virală 276
Mcanismele persistentei virale 277
Infecţii persistente la om 278
Interferonii si mecanismele acţiunii lor 282
Activitaţi biologice efectoare ale interferonilor 283
Bazele moleculare ale activitaţii interferonilor 284
Perspectivele producerii si utilizarii interferonilor 288
Bacteriofagii 288
Anatomia moleculară a fagilor din seria T-par 290

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Relaţiile fag-bacterie 292
Ciclul litic al interacţiunii fag-bacterie. Multiplicarea bacteriofagului 292
Importanţa fenomenului de bacteriofagie 299
Ciclul lizogen 300
Reglarea interacţiunii fag λ -E. coli 303
Controlul genic al interacţiunii lizogene 303
Proprietăţile bacteriilor lizogene 305
Importanţa studiului cuplului lizogen E. coli-fag λ 306
Oncogeneza virală 307
Caracterele generale ale celulelor normale 308
Particularităţile funcţionale ale celulelor maligne 309
Virusuri oncogene 311
Oncogenele celulare 312
Mecanismele transformării maligne cu virusuri oncogene 315
Oncogeneza cu retravirusuri transductoare 315
Oncogeneza cu retravirusuri netransductoare 316
Interacţiunea oncodnavirusurilor cu celulele 319
Mecanismele generale ale transformării maligne cu oncodnavirusuri 320
Transformarea cu papovavirusuri 321
Transformarea cu papilomavirusuri 323
Dezvoltarea verucilor 324
Transformarea cu adenovirusuri 325
Transformarea cu herpesvirusur 326
Transformarea cu hepadnavirusuri 327
Vaccinuri virale 328
Vaccinuri unitare 329
Vaccinuri subunitare 330
Tehnici moderne de obţinere a vaccinurilor subunitare 331

Virusuri cu genom defectiv 332
Agenti infecţioşi subvirali 335
Viroizii 335
Patogenitatea viroizilor 337
Virusoizii 339
Virino 339
Prionii 339
Originea prionilor 340
Natura virusurilor 343
Evoluţia virusurilor 344
Originea virusurilor din acizii nucleici celulari 345
Recombinarea la dezoxiribovirusuri 346
Originea şi evoluţia ribovirusurilor 347
Rolul mutaţiilor în evoluţia ribovirusurilor 348

Capitolul VII. **NOŢIUNI DE GENETICĂ BACTERIANĂ**
Organizarea funcţională a genomului bacterian 350
Plasmidele 351
Clasificarea plasmidelor 351
Structura moleculară a plasmidelor 352
Structura genetică şi funcţiile plasmidelor 352
Controlul numărului de copii plasmidiale 353
Incompatibilitatea plasmidelor 354
Eliminarea plasmidelor 354
Replicarea plasmidelor 354
Distribuţia plasmidelor in procesul diviziunii celulare 356
Recombinarea plasmidelor 356
Plasmidele F 357
Plasmidele R 358
Rezistenţa bacteriană la antibiotice 359
Mecanismele genetice ale rezistenţei la antibiotice şi la agenţi chimioterapeutici 359
Cauzele fenomenului de rezistenţă la antibiotice 360

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Plasmidele "Col" 361
Mecanismele de acţiune a bacteriocinelor 362
Mecanismele variabilităţii la bacterii 362
1. Mutaţiile 362
Reparaţia genetică *368*
Mecanisme de reparaţie genetică 368
Fotoreactivarea 368
Răspunsul reparator adaptativ 369
Excizia bazelor catalizată de glicozilaze si endonucleaze 370
Reparaţia prin excizia şi resinteza nucleotidelor 371
Reparaţia prin recombinare post-replicativă 372
Sistemul reparator inductibil "SOS" 372
Semnificaţia biologică a sistemelor de reparare 373
2. Elementele genetice transpozabile ale bacteriilor 373
Secvenţele de inserţie 374
Transpozonii compuşi (micşti) 375
Transpozonii complecşi 376
Transpozonii conjugativi 376
Bacteriofagii transpozanţi 376
Integronii 378
Transpoziţia 379
Consecinţele transopoziţiei 381
3. Mecanisme de transfer al materialului genetic la bacterii 382
Transformarea genetică 383
Mecanismul molecular al transformării genetice 385
Conjugarea bacteriană 388
Determinismul genetic al procesului de conjugare 390
Etapele procesului de conjugare 390
Rolul pililor în procesul de conjugare 391
Transferul ADN plasmidial în cuplul F^+ x F 392
Mecanismul molecular al transferului factorului F 392
Transferul ADN cromosomal în cuplul Hfr x F 393
Conjugarea mediată de transpozoni 394
Sexducţia 395
Transducţia genetică 395
Transducţia plasmidelor 398
Conversia fagică 399
Transfecţia 399
Reglarea activităţii celulei bacteriene 400
Modelul reglator al operonului 401
Reglarea pozitivă(Inducţia sintezei enzimelor) 402
Reglarea negativă a operonului lac 403
Represia sintezei enzimelor într-un sistem biosintetic. Operonul triptofanului 404
Controlul activităţii enzimelor. Inhibiţia prin produsul final 405
Controlul sintezei proteice la nivelul traducerii 406
Represia prin catabolit 406
Principii de inginerie genetică 407
Ingineria genetică la nivel celular 408
Fuziunea protoplaştilor bacterieni 408
Premisele ştiinţifice ale ingineriei genetice moleculare 409
Enzimele de restricţie 410
Mecanismul de acţiune a enzimelor de restricţie 411
Enzimele de modificare 412
Etapele reprogramării microorganismelor prin tehnologia ADN recombinant(clonarea moleculară) 412
Obţinerea fragmentelor de ADN utilizate pentru clonare 413
Aplicaţii ale clonării moleculare 415
Realizări ale biotehnologiei cu microiorganisme 415

UTILIZAREA MICROORGANISMELOR IN BIOTEHNOLOGIE 417
Bioreactoare 418
Fazele culturii unui microorganism industrial 418

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Scopul biotehnologiilor cu microorganisme 419
Enzime glicolitice 421
Proteaze 422
Aplicaţii ale proteazelor 423
Celulaze 424
Lipaze 424
Acidul lactic 425
Acidul citric 425
Acidul acetic 425
Aminoacizi 425
Vitamine 426
Utilizarea levurilor in microbiologia industrială 426
Fermentaţia alcoolică 426
a. Obţinerea alcoolului etilic din cartofi şi cereale427
b. Utilizarea levurilor in vinificaţie 428
c. Utilizarea levurilor în industria berii 428
d. Utilizarea levurilor în panificaţie 429
Biosinteza substanţelor antibiotice 430
Biosinteza penicilinei 431
Metode de ameliorare a producţiei de antibiotice 432
Bioconversia steroizilor 433

Capitolul VIII. **GRUPE DE MICROORGANISME EUCARIOTE**

Alge 435
Organizare celulară şi fiziologie 435
Reproducere 436
Clasificare 437
Chlorophyta(Alge verzi) 437
Phaeophyta (Alge brune) 439
Rhodophyta(Alge roşii) 439
Bacillariophyta(Diatomee) 439
Pyrrophyta(Dinoflagelate) 441
Euglenophyta 441
Importanţa algelor 442
"Inflorirea" algală 443
Importanţa medicală a algelor 443
Protozoare 444
Organizare celulară şi fiziologie 444
Reproducerea 447
Clasificare 449
Mastigophora (Flagelate) 449
Sarcodina 451
Sporozoa 452
Ciliophora 455
Fungii 457
Organizare celulară şi fiziologie 457
Reproducerea 458
Clasificare *460*
Oomycetes 460
Zygomycetes 461
Ascomycetes 462
Basidiomycetes 464
Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) 465
Myxomycetes (Gymnomyxa) 466
Importanta fungilor 467
Fungi patogeni 468
Micotoxine 469

Capitolul IX. **BIODIVERSITATEA MICROORGANISMELOR**

Importanţa studiilor de biologie moleculară 473
Particularităţile diversităţii microorganismelor în diferite ecosisteme 475
Semnificaţia marii diversităţi microbiene într-un habitat 476

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Capitolul X. NOŢIUNI DE ECOLOGIA MICROORGANISMELOR
A. INTERACŢIUNILE DINTRE POPULAŢIILE DE MICROORGANISME 478
Neutralismul 478
Interacţiuni pozitive 478
Comensalismul 479
Protocooperarea 479
Sinergismul 479
Mutualismul 479
Sintrofia 480
Interacţiuni negative 480
Competiţia 480
Amensalismul 480
Antibioza 480
Simbioza 481
Adaptări consecutive simbiozei 482
Rolul endosimbiozei în geneza celulei eucariote 483
Semnificaţia biologică a simbiozelor 483
Simbioze insecte-microorganisme 484
Ectosimbioze 484
Simbiozele fixatoare de N_2
Simbioza Rhizobium-plante leguminoase 485
Formarea nodozitatilor 486
Morfologia nodozităţii 487
Eliberarea bacteriilor din cordonul infecţios 487
Fiziologia nodozităţii 487
Simbiozele asociative. Fixarea azotului în rizosferă 488
Actinorizele. Simbioza Frankia-angiosperme neleguminoase 488
Cianobacterii fixatoare de azot.Simbioza Azolla-Anabaena azollae 489
Simbioza cianobacterii – fungi sau alge – fungi (Lichenii) 489
Micorizele *491*
Ectomicorize 491
Endomicorize. Micorizele veziculo-arbusculare 492
Micorizele ectoendotrofe 493
Rolul micorizelor in biologia plantelor 494
Parazitismul 494
Parazitismul intracelular 494
Tipuri de parazitism intracelular 494
Prădarea 495
Procariote prădătoare 495

B. MICROBIOTA NORMALA A ORGANISMELOR ANIMALE
Colonizarea şi succesiunea populaţiilor de microorganisme asociate organismului uman 497
Microbiota tractului respirator 497
Microbiota tractului digestiv 498
Habitatele microbiotei gastrointestinale 498
Relaţia dintre structura sistemului digestiv şi microbiota normală 499
Rolul fiziologic al microbiotei gastrointestinale 499
Translocaţia bacteriilor din intestin 501
Microbiota tractului urogenital 501
Microbiota normală a pielii 502
Microbiota din rumen 502
Rolul microorganismelor din rumen 503
Microorganismele probiotice 504
Gnotobioza şi animalele gnotobiotice 504
Caracteristicile anmalelor "germ-free" 505
Rolul microbiotei normale 505

C. PROPRIETĂŢILE MICROORGANISMELOR PATOGENE
Patogenitatea 506
Virulenţa 507

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

a) Infecţiozitatea *507*
Aderenta celulelor bacteriene de celulele gazdei 508
Adezinele 508
Adezinele polizaharidice ca factori de virulenţă 509
Receptori de adezine 509
Sideroforii ca factori de virulenţă 510
b) Agresivitatea (Invazivitatea) 511
c) Toxigenitatea 512
Clasificarea toxinelor 512
Exotoxine 513
Determinismul genetic al sintezei exotoxinelor 514
Sinteza si eliberarea toxinelor 514
Receptori celulari pentru toxine 515
Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă 515
Rolul exotoxinelor în patogeneza bacteriană 516
Endotoxine 516
Efectele endotoxinelor LPS 517
Relaţia dintre patogenitate si parazitism 519
Mecanisme de supravieţuire a bacteriilor patogene în celula gazdă 519
Interacţiunea agenţilor patogeni cu sistemul imnitar 520
Variaţia antigenică 521
Microorganismele oportuniste 521
Condiţile de apariţie a procesului infecţios 522
a) Izvorul de infecţie 522
b) Căile de eliminare a agenţilor patogeni 523
c) Căile de transmitere a agenţilor infecţioşi 524
d) Poarta de intrare in organism 52
Infecţia. Tipuri de infecţii 525
Modalităţile de manifestare a patologiei infecţioase 526
Posibilităţi de evoluţie a procesului infecţios 527
Etapele maladiei infecţioase 528
Tipuri de evoluţie epidemiologică a infecţiei 529

D. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN CIRCUITUL GLOBAL AL MATERIEI ÎN NATURĂ
Circuitul biogeochimic al azotului *530*
Amonificarea 531
Nitrificarea *533*
Denitrificarea 533
Circuitul oxigenului 534
Circuitul carbonului 535
Degradarea biologică a constituienţilor vegetali 535
Degradarea biologică a celulozei 536
Structura şi morfologia fibrelor de celuloză 537
Microorganisme celulozolitice 537
Sistemul enzimelor celulazice 538
Degradarea microbiană a hemicelulozelor 538
Degradarea microbiană a ligninei 539
Degradarea chitinei 539
Scoaterea din circuit a carbonului organic sau anorganic 540
Circuitul fosforului in natură 540
Circuitul sulfului in natuiră 541
Mineralizarea compuşilor organici ai sulfului 542
Oxidarea compuşilor anorganici ai sulfului 542

E. NOŢIUNI DE MICROBIOLOGIA APELOR
Tipurile de medii acvatice 544
Factorii fizici si chimici care influenţează prezenţa microorganismelor in mediile acvatice 545
Comportamentul microorganismelor in mediul salin 546
Oligotrofia 547
Microbiota apelor curgatoare 547

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Habitate si comunităţi specifice microbiotei acvatice 549
Marea ca mediu natural pentru microorganisme 549
Zonarea eclogică a mediului marin 550
Microbiota marină 550
Degradarea substanţelor organice în ocean 551

F. ACTIVITATEA GEOLOGICĂ A MICROORGANISMELOR
Transformările microbiene ale mineralelor 552
Transformările microbiene ale fierului şi manganului 553
Recuperarea metalelor prin acumulare de către microorganisme 554
Rolul microorganismelor în formarea zăcămintelor de petrol 555
Etapele genezei petrolului 556
Rolul microorganismelor in eliberarea, migrarea şi acumularea ţiţeiului în zăcământ 556

G. NOŢIUNI DE MICROBIOLOGIA SOLULUI
Solul ca mediu natural pentru microorganisme 557
Formarea solului 558
Materia organică din sol 559
Humusul 560
Factorii de mediu care influenţează natura, numărul şi activitatea microorganismelor 561
Microbiota din sol 562
Interacţiuni intre rădăcinile plantelor şi microorganismele din sol. Rizosfera 565
Efectele microorganismelor asupra plantelor 567

H. BIODEGRADAREA SI BIODETERIORAREA MICROBIANĂ
Modificări ale substratului induse de acţiunea microorganismelor 568
Biodegradarea petrolului 568
Biodeteriorarea cauciucului 569
Degradarea tesuturilor vegetale asociata cu termogeneza microbiana 570
Coroziunea bacteriană a metalelor 570
Coroziunea oxidativă 572
Biosolubilizarea metalelor. "Leşierea" bacteriană 572
Degradarea microbiană a substanţelor xenobiotice 573
Clasificarea substanţelor xenobiotice cu caracter de poluanţi ai mediului înconjurător 574
Efectele ecologice ale substantelor xenobiotice 574
Degradarea compuşilor xenobiotici 575
Co-metabolismul 576
Procesele de co-metabolism în natură 576
Bazele genetice ale degradării compuşilor organici halogenaţi 577
Incapacitatea poluanţilor de a induce sinteza enzimelor degradative 578
Consecinţe ecologice ale prezenţei substanţelor xenobiotice în natură 579
Bibliografie selectivă 581

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CUVÂNT ÎNAINTE

Cartea intitulată „Microbiologie generală şi Virologie" cuprinde, într-o formă sintetică, problematica generală a Microbiologiei şi Virologiei.

Microbiologia este un domeniu foarte diversificat, ca o reflectare a răspândirii ubicvitare a microorganismelor, dar în special, datorită multiplelor activităţi fiziologice pe care le desfăşoară şi care fac obiectul de studiu al unor ramuri speciale: *Microbiologia industrială, Microbiologia solului, Hidromicrobiologia, Microbiologia medicală, Ecologia microorganismelor* etc. De aceea, se impune precizarea că *Microbiologia generală* este un concept pur biologic care se ocupă cu studiul particularităţilor generale ale structurii şi funcţiilor celulei bacteriene, rolul lor în mediile naturale şi în interacţiunile cu micro- şi macroorganismele.

În acest context, am considerat că este necesară, în primul rând, cunoaşterea structurii şi fiziologiei bacteriene, pentru a oferi suportul ştiinţific necesar înţelegerii mecanismelor de acţiune a diferiţilor factori fizici şi chimici asupra celulei bacteriene, rolul microorganismelor în ecosistemele naturale, precum şi posibilităţile utilizării celor de interes industrial.

În titlul cărţii am menţionat în mod special, capitolul de *Virologie*, fiind consecvent ideii că virusurile nu sunt vii, nu sunt microorganisme şi, în consecinţă, includerea lor sub titulatura Microbiologiei ar fi incorectă din punct de vedere ştiinţific şi ar fi în contradicţie cu convingerile autorului.

Capitolul de *Virologie* precede capitolul de *Genetică bacteriană*. Am optat pentru această succesiune, deoarece *Genetica bacteriană* se bazează într-o măsură semnificativă, pe studiul cuplului *E. coli*-fag λ.

Această lucrare rămâne numai o încercare de a reuni într-un tot unitar, noţiuni aparent disparate, dar alăturarea lor conturează, din punct de vedere structural şi funcţional, o lume specială, invizibilă cu ochiul liber, perceptibilă numai prin efectele ei benefice sau dăunătoare.

În acest volum am inclus o prezentare generală a microorganismelor eucariote, încercând astfel să materializez ideea „Microbiologiei mari".

Lucrarea este un „test de rezistenţă", în a cărei finalizare nu am crezut mult timp, datorită dificultăţilor multiple cu care m-am confruntat pe parcursul mai multor ani de căutări, formulări şi reformulări şi, nu în ultimul rând, datorită conţinutului ei foarte heterogen. De aceea, rămân îndatorat şi recunoscător acelora care vor face observaţii critice întemeiate la adresa conţinutului acestei cărţi.

În ciuda eforturilor uneori deznădăjduite, finalizarea acestei lucrări nu ar fi fost posibilă, dacă nu ar fi beneficiat de informaţia ştiinţifică finisată şi elaborată cu migală de bijutier, de D-l Acad. Profesor dr. doc. G. ZARNEA, un maestru inegalabil al stilului ştiinţific. Este o plăcută datorie de suflet şi conştiinţă şi, în egală măsură, o onoare, să fac cunoscut celor care vor încerca să pătrundă sensul ştiinţific al acestei cărţi, că aici este încorporată o parte importantă a edificiului ştiinţific pe care D-l Profesor G. ZARNEA l-a clădit cu talent şi trudă, timp de o viaţă, dedicată Microbiologiei, Virologiei şi Imunologiei. Această carte s-a născut pe platforma celor 5 volume ale TRATATULUI DE MICROBIOLOGIE GENERALĂ care au constituit un îndreptar şi un reper la care m-am raportat permanent.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru generozitatea efortului constructiv prin care a creat o platformă științifică de mare amploare, în care a încorporat marile descoperiri ale revoluțiilor biologice, pentru sfaturile pe care mi le-a dat cu prilejul frecventelor discuții, rămân profund îndatorat și recunoscător D-lui Profesor G. ZARNEA, cel care mi-a oferit fericita ocazie de a finaliza această lucrare, pe care o consider un început pe drumul lung și greu, dar de o frumusețe aparte, al *Microbiologiei* și *Virologiei*.

Cartea se adresează, în primul rând, studenților secției de Biochimiei, a Facultății de Biologie din București, dar precizez că este utilă, fără nici-o restricție, tuturor studenților facultății noastre și tuturor celor interesați de problemele generale de *Microbiologie* și *Virologie*.

Autorul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

PREFAȚĂ

Microbiologia - unul dintre domeniile cele mai dinamice ale științelor biologice - s-a remarcat în ultima jumătate de secol, printr-o serie de descoperiri de mare importanță, care, pe de o parte, au determinat o restructurare fundamentală a propriilor concepte și aplicații și, pe de alta, printr-un impact cu totul deosebit asupra biologiei, medicinii, biotehnologiei, științei mediului etc.

În acest cadru, științele microbiologice au avut un rol determinant în fundamentarea principiilor biologiei moleculare, a ingineriei genetice, a perspectivei de reprogramare genetică a organismelor și biotehnologiei, pentru ca în ultimul deceniu să deschidă orizonturi noi asupra evoluției lumii vii, prin stabilirea bazelor teoretice și practice ale filogeniei moleculare.

Într-un astfel de context, apariția unei lucrări ample, moderne de sinteză, consacrată Microbiologiei generale, este bine venită și necesară, deoarece interesul pentru problematica acestui incitant domeniu, depășește cu mult limitele acestei științe.

Lucrarea excelentă prezentată de Domnul Prof. dr. Grigore Mihăescu, răspunde acestui deziderat. Ea reunește într-o sinteză clară, toate problemele importante ale domeniului, fiind prima lucrare de acest gen care prezintă într-o formă integrată, toate categoriile de microorganisme (bacterii, fungi, microalge, protozoare). Ea abordează, practic, toate domeniile Microbiologiei generale clasice (unele dintre ele devenite discipline independente) și beneficiază de un amplu capitol, consacrat agenților infecțioși neanimați (virusuri, viroizi, virusoizi, virino, prioni), care prin acțiunea lor, au marcat profund societatea umană.

Datele prezentate în acest volum, sunt în concordanță cu cele mai noi cunoștiințe ale domeniului pe plan mondial, care evidențiază imensa diversitate a lumii microorganismelor, rolul lor fundamental în întreținerea vieții pe Pământ, prezența masivă și ubicvitară în biosferă, efectele favorabile și dăunătoare etc.

Am citit cu deosebită satisfacție manuscrisul lucrării și am apreciat, în mod deosebit, bogăția informației, rigurozitatea științifică, claritatea cu care sunt prezentate chiar capitolele cele mai dificile.

*Îmi exprim convingerea că volumul „**Microbiologie generală și Virologie**", elaborat de prof. dr. Grigore Mihăescu, reprezintă o lucrare de o deosebită valoare și o recomand cu toată căldura, nu numai studenților biologi și biochimiști, ci și oricărui biolog, preocupat să cunoască stadiul actual al științelor microbiologice și al biologiei, în general.*

Sunt convins că, actualizată periodic și redactată, cartea profesorului dr. Grigore Mihăescu este menită să aibă o viață îndelungată.

Martie 2000

*Acad. Prof. dr. **G. ZARNEA***

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

INTRODUCERE

Obiectul de studiu al Microbiologiei este biologia microorganismelor, adică studiul organismelor mici, vizibile numai la microscop.

Noţiunea de microorganism nu are semnificaţie taxonomică, deoarece reuneşte un grup vast şi heterogen de organisme diferite ca poziţie sistematică şi ca organizare structurală, dar care se aseamănă prin trei proprietăţi comune:

- toate au *dimensiuni microscopice*, ceea ce le face invizibile cu ochiul liber;
- în general au *organizare unicelulară*. Chiar dacă unele microorganisme formează asociaţii pluricelulare, ele rămân, în esenţă, organisme unicelulare, deoarece, o celulă izolată din complexul multicelular îşi păstrează viabilitatea, creşte, se divide şi reface asociaţia;
- structura lor internă este relativ simplă, comparativ cu a macroorganismelor.

Heterogenitatea microorganismelor este definită de alte trei caracteristici:

- *poziţia sistematică* a microorganismelor este foarte diferită;
- *activităţile biologice* (fiziologice) pe care le desfăşoară sunt foarte diversificate
- *morfologia şi structura* internă a diferitelor grupe de microorganisme sunt foarte diferite.

Cadrul larg al noţiunii de microorganism cuprinde următoarele grupe:

- *Eubacteria* (bacterii adevărate);
- *Cyanobacteria* (fostele "algc" albastre-verzi)
- *Archaea*, un grup de microorganisme asemănătoare cu bacteriile adevărate, din punct de vedere morfologic şi structural.

Toate cele trei grupe au organizare celulară de tip *procariot*. Celelalte microorganisme, cu poziţie sistematică heterogenă, au organizare celulară de tip *eucariot:*

- *Fungii microscopici*, cu un număr mare de reprezentanţi;
  - levurile cu organizare unicelulară
  - mucegaiurile (fungi filamentoşi), cu organizare pluricelulară;
- *Algele microscopice*
- *Protozoarele.*

Etimologic, noţiunea de *microorganism* are sensul de *organism mic*. Cu acelaşi sens se foloseşte notiunea de *microb*, mai ales în cazul microorganismelor patogene. Deşi utilizat în mod curent, termenul de "microb" nu este ştiinţific. Notiunea de "microb" a fost introdusă de Sedillot (1878), cu sensul ei ştiinţific: *micro* + *bios* = viaţă scurtă. Termenul s-a păstrat şi a dat numele domeniului *Microbiologiei*.

Denumirea de *bacterie* a fost introdusă de Ehrenberg (1838). El a creat denumiri de gen*: Bacterium, Spirillum, Spirochaeta,* fără să stabilească deosebiri între bacterii şi protozoare.

Deşi virusurile nu sunt microorganisme, această lucrare cuprinde un capitol de *Virologie* în care sunt prezentate, într-o formă generală, virusurile şi entităţile moleculare infecţioase cu organizare subvirală (viroizii şi prionii).

Virusurile sunt entităţi infecţioase cu un nivel înalt de organizare, alcătuite în esenţă, din proteine şi un acid nucleic (ADN sau ARN). Studiul interacţiunii virus-celulă (în special fag λ-*E. coli*) a avut un rol decisiv în dezvoltarea biologiei moleculare.

Viroizii sunt entităţi infecţioase alcătuite dintr-o moleculă de ARN pur, patogene pentru unele plante de cultură.

Prionii sunt entităţi infecţioase de natură *proteică*. Pentru studii referitoare la natura lor, modalitatea de transmitere şi la mecanismele patogenezei, lui S. Prusiner, în 1997, i s-a decernat Premiul Nobel.

BIBLIOTECA

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Evoluţia Microbiologiei ca ştiinţă

Microbiologia este o ştiinţă relativ tânără. Ea s-a cristalizat ca un domeniu particular al ştiinţelor biologice, în a II-a jumătate a secolului 19.

În 1655, A. Kircher a intuit existenţa unor forme de viaţă, invizibile cu ochiul liber. Primele microorganisme au fost văzute cu ajutorul unui aparat optic de mărire a imaginii, de către olandezul A.van Leevenhoek în 1676. Cu aparatele sale de construcţie proprie, el a examinat picături de apă din diferite surse naturale sau de salivă cu raclaj dentar şi a observat o lume fascinantă, cu densităţi neobişnuite, într-o mişcare perpetuă. În descrierile şi în desenele sale pe care le-a prezentat Societaţii Regale din Londra, printre alte organisme se recunosc bacteriile. Dar gândirea de atunci nu a reuşit să reunească lumea microorganismelor cu restul lumii vii. Din acest motiv, până în 1976, Leevenhoek a fost considerat descoperitorul bacteriilor. în 1976, la 300 de ani de la descrierea lor, chiar cercetătorii olandezi au hotărât că este nedrept ca Leevenhoek să fie considerat descoperitorul bacteriilor, deoarece el nu a intuit particularităţile structurale şi nici funcţionale ale acestor organisme, ci le-a considerat ca fiind nişte "pui" ai animalelor acvatice mai mari. De aceea le numea "animalcule". Deşi lupele sale aveau o putere de mărire net superioară celor de azi, Leevenhoek nu a sesizat noutatea lumii pe care a văzut-o.

Caracterele aparte ale microorganismelor au fost intuite de F. Cohn (1875). El este considerat *întemeietorul Microbiologiei ca stiinţă.*

De o importanţă exceptională pentru dezvoltarea Microbiologiei sunt descoperirile lui L.Pasteur (1822-1895). El era preocupat de activităţile fziologice ale microorganismelor, în special fermentative şi patologice. Pentru a le descrie, Pasteur foloşeste diferite denumiri: ciuperci, infuzori, bacterii, levuri, monade. El a înfiinţat primele laboratoare de cercetare microbiologică. Contribuţiile sale de excepţie se inscriu în următoarele domenii:

- a demonstrat experimental, că fermentaţiile nu sunt procese pur chimice, ci sunt procese biologice, rezultatul activităţii metabolice a microorganismelor anaerobe. A definit procesul fermentativ ca fiind rezultatul "vieţii fără aer" a microorganismelor anaerobe. Odată cu descrierea proceselor fermentative, Pasteur a pus bazele *Microbiologiei industriale;*
- a pus bazele teoretice ale *Microbiologiei medicale*, demonstrând cauzele producerii maladiilor infecţioase. Până atunci se cunoştea caracterul transmisibil (contagios) al acestora, dar nu se ştia că ele sunt rezultatul pătrunderii în organism a unor agenţi patogeni;
- a demonstrat că proprietăţile de patogenitate şi virulenţă a microorganismelor se pot modifica în *vitro*. Astfel, din culturile de bacterii patogene derivă culturi cu virulenţă *atenuată*, care se pot utiliza ca vaccinuri. Pasteur a pus astfel bazele unei activităţi practice de o importanţă practică excepţională – *vaccinarea;*
- a fundamentat ştiinţific domeniul imunităţii antiinfecţioase, creind un domeniu nou al ştiinţelor biologice – *Imunologia*, născută ca o ramură a Microbiologiei, dar care ulterior s-a separat complet, ca un domeniu de sine stătător;
- a pus bazele *Bacteriologiei medicale* umane şi veterinare;
- este întemeietorul primului *Institut de Microbiologie* din lume – Institutul Pasteur din Paris;
- în plan teoretic, Pasteur a a rezolvat controversa *generaţiei spontane*, demonstrând cu argumente experimentale că microorganismele sunt forme de viaţă cu un grad înalt de organizare, ce nu pot lua naştere spontan din materia organică. Totdeauna microorganismele îşi au originea în alte celule, care contaminează materia organică.

În 1897, Beijerinck a descoperit *virusurile*. El a intuit natura particulară a agentului mozaicului la tutun şi l-a considerat ca fiind "contagium, vivum, fluidum" (agent contagios, viu-corpuscular-filtrabil). Iniţial, *Virologia* s-a dezvoltat ca o ramură a Microbiologiei, dar raportându-ne la natura particulară a virusurilor, *Virologia* este o ştiinţă independentă.

La noi în ţară, V. Babeş, împreună cu Cornil (Franta) este autorul primului *Tratat de Bacteriologie* din lume. În sistemul nervos al animalelor moarte de turbare a descris prezenţa incluziilor Babeş-Negri.

I.Cantacuzino este întemeietorul *Institutului de Microbiologie* şi mentorul scolii de Microbiologie din perioada interbelică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Diviziunile Microbiologiei

Diversitatea proceselor fiziologice bacteriene, precum şi rolul lor esenţial în ecosistemele naturale, dar şi capacitatea de a sintetiza substanţe utile sau de a produce procese infecţioase la organismele superioare au creat, încă de la începuturile dezvoltării sale ca ştiinţă, premisele diversificării domeniilor de studiu al microorganismelor, unele cu un accentuat caracter utilitar.

Microbiologia industrială s-a dezvoltat pornind de la descoperirea proceselor fermentative de către Pasteur. Ea studiază utilizarea microorganismelor producătoare de substanţe utile pentru alimentaţie, terapeutică sau pentru diferite industrii. Domeniul s-a extins la studiul proceselor de biosinteză şi bioconversie.

Microbiologia solului studiază ansamblul microorganismelor din sol, interrelaţiile dintre ele, precum şi interacţiunile dintre microorganisme şi plante, dar în mod deosebit, rolul microorganismelor în fertilitatea solului şi în circuitul elementelor biogene în natură.

Geomicrobiologia se distinge prin caracterul ei pregnant utilitar. Studiază, în special, microbiologia petrolului: rolul microorganismelor în geneza petrolului; posibilitatea utilizării microorganismelor în exploatarea petrolului; rolul microorganismelor în biodegradarea petrolului. Studiază rolul microorganismelor în geneza zăcămintelor minerale şi posibilitatea utilizării microorganismelor pentru exploatarea zăcămintelor şi pentru recuperarea metalelor din zăcămintele sărace.

Hidromicrobiologia studiază microorganismele din mediile aquatice şi rolul lor în lanţurile trofice. *Microbiologia marină*, ramură a *Hidromicrobiologiei* studiază microorganismele din marile bazine de apă sărată, dar în special rolul lor în circuitul elementelor biogene.

Microbiologia insectelor studiază relaţiile dintre microorganisme şi artropode. S-a concretizat ca domeniu de sine stătător datorită rolului important pe care îl au artropodele in patologia umană, animală şi vegetală, ca vectori ai unor microorganisme patogene şi ai unor virusuri.

Microbiologia medicală studiază microorganismele patogene pentru om şi animale. Studiază particularităţile lor fundamentale, adică *patogenitatea şi virulenţa*, factorii care condiţionează virulenţa, precum şi modul lor de transmitere şi posibilităţile de combatere.

Ecologia microorganismelor este o ştiinţă de sinteză care stabileşte legităţile generale de evoluţie şi interacţiune a microorganismelor în natură. Studiază interacţiunile dintre microorganisme, precum şi interrelaţiile microorganismelor cu macroorganismele.

Genetica microorganismelor este o ramură tânără, conturată după 1940. Studiază substratul molecular al *eredităţii şi variabilităţii* microorganismelor şi mecanismele de transfer al materialului genetic la bacterii.

Microbiologia generală este o ştiinţă biologică fundamentală, care studiază particularităţile generale ale organizării structurale şi funcţionale ale celulei bacteriene, biologia şi sistematica lor, răspândirea lor în natură, relaţiile lor ecologice cu alte microorganisme şi cu microorganismele, originea şi evoluţia lor, fenomenele de ereditate şi variabilitate microbiană. Microbiologia generală este o ştiinţă de sinteză şi se bazează pe datele domeniilor aplicative ale microbiologiei. Cadrul larg al microbiologiei generale, contribuţia sa imensă la dezvoltarea multor ramuri ale biologiei şi implicaţiile ei teoretice şi practice în evoluţia altor stiinţe, determinate de posibilitatea utilizării microorganismelor ca model experimental, fac ca o cunoaştere a principiilor fundamentale ale microbiologiei generale să fie de o necesitate absolută pentru orice biolog modern – indiferent de domeniul său de specialitate – ca şi pentru biochimist şi biofizician, genetician, medic, agronom, cercetător în industria fermentativă etc.

Importanţa practică a microorganismelor

De la descoperirea lor şi până astăzi, interesul pentru studiul microorganismelor a înregistrat o creştere permanentă, deoarece un mare număr de specii desfăşoară activităţi benefice, realizând procese de o valoare imensă pentru societatea umană sau produc infecţii la om şi animale, cu efecte patologice mai mult sau mai puţin grave.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În industria farmaceutică, producţia de antibiotice (circa 100 000 t/an) este rezultatul activităţii microorganismelor.

Fertilitatea şi productivitatea sistemelor agricole depind în mare măsură de activităţi fiziologice ale bacteriilor din sol. Bacteriile fixatoare de N_2 din g. *Rhizobium* produc nodozităţi pe rădăcinile plantelor leguminoase. Ele reduc N_2 la NH_4, pe care îl pun la dispoziţia plantei gazdă, fiind utlizat pentru sinteza proteinelor proprii. Astfel, bacteriile simbiotice, dar într-o măsură mai mică şi cele libere reduc necesarul de fertilizatori pentru producţia agricolă. Alte bacterii din sol, prin reducerea nitraţilor, realizează procesul *denitrificării,* diminuând fertilitatea.

Microorganismele care populează tractul digestiv al animalelor şi al omului formează *microbiota normală*, ce sintetizează vitamina K, esenţială pentru mamifere, acid folic, nicotinic, pantotenic, tiamina, riboflavina, biotina. De o importanţă deosebită este microbiota din compartimentul ruminal al mamiferelor rumegătoare. Rumenul are rolul unui fermentator natural, în care substratul vegetal este transformat în masă celulară, formată în special din bacterii şi protozoare. Microorganismele constituie adevărata sursă de proteine a ierbivorelor. Fără microbiota ruminală, producţia ierbivorelor ar fi imposibilă.

Microorganismele au roluri multiple în *industria alimentară*. Majoritatea microorganismelor contaminante au acţiune degradativă şi de aceea alimentele trebuie protejate prin conservare chimică, prin îngheţare sau uscare. Unele microorganisme au efecte favorabile asupra unor produse alimentare: brânzeturile, iaurtul şi alte derivate din lapte sunt rezultatul activităţii fiziologice a unor microorganisme asupra substratului.

Dospirea aluatului de pâine, dar şi vinul sunt rezultatul fermentaţiei alcoolice produsă de levuri. Conservarea alimentelor vegetale şi a furajelor se bazează pe fermentaţia lactică produsă be bacterii.

Microorganismele sunt utilizate pentru producerea băuturilor acidulate. Acidul citric, adăugat multor băuturi pentru conferirea aciditătii este produs industrial de *Aspergillus*. De multe ori, astfel de băuturi conţin fructoza, obţinută din amidonul de porumb, prin acţiunea bacteriilor amilolitice. *Aspartamul*, ca îndulcitor este un amestec de doi aminoacizi (acidul aspartic şi fenilalanina), ambii obţinuţi pe cale microbiologică.

Metanul este produs prin acţiunea bacteriilor metanogene. Un interes deosebit prezintă microorganismele în raport cu industria petrolului. Petrolul brut este supus atacului viguros al microorganismelor şi de aceea forarea, exploatarea, dar în special depozitarea, se fac în condiţii care minimalizează acţiunea microorganismelor.

Microorganismele fotosintetizante utilizează energia solară pentru producerea biomasei, care poate fi convertită, ca şi deşeurile vegetale, în *biocombustibili* (metan şi etanol), de alte microorganisme.

Activitatea umană diminuă rezervele diferitelor substanţe (metale) şi microorganismele se folosesc pentru recuperarea metalelor din minereurile sărace.

Unul dintre cele mai importante domenii practice ale Microbiologiei este *biotehnologia*. În sens larg, biotehnologia utilizează microorganismele în procesele industriale, dar în ultimii 10–15 ani, biotehnologia foloseşte microorganisme reprogramate genetic, prin tehnicile de *inginerie genetică*.

În mediile naturale, microorganismele realizează treapta *mineralizării* (descompunerii) materiei organice vegetale şi animale, având astfel un rol decisiv pentru închiderea ciclului unor elemente biogene în natură (C, N, P, S), făcându-le disponibile pentru reintegrarea lor în circuitul vieţii.

Importanţa microorganismelor a fost subliniată de Pasteur în aserţiunea "rolul unor fiinţe infinit de mici este infinit de mare".

Microorganismele nu sunt numai benefice pentru activitatea umană. Un număr relativ mic de de microorganisme patogene, cauzează o largă diversitate de procese patologice, de la infecţii locale, până la septicemii.

Bacteriile sunt importante atât din punct de vedere practic cât şi teoretic, pentru studiul proceselor vieţii în condiţii extreme. Unele bacterii supravieţuiesc în condiţiile cele mai neadecvate: temperaturi extreme, desicare, îngheţare, iar bacteriile *extremofile*, pentru creşterea optimă sunt dependente de condiţii speciale de mediu: presiunea uriaşă a abisurilor marine, temperaturi de 70 – 100 grade, concentraţii saline apropiate de nivelul de saturare a soluţiei de NaCl.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Poziţia microorganismelor în sistemele de clasificare a lumii vii

În sistemul vechi de clasificare al lui Aristotel, lumea vie este împărţită în două regnuri: *Plantae şi Animalia*. Odată cu descoperirea altor grupe de organisme, această clasificare a devenit nesatisfăcătoare, astfel încât numărul regnurilor s-a extins treptat

Hogg (1860) şi Haeckel (1866) au sesizat dificultăţile de încadrare a unor organisme (*Euglena, Chlamydomonas*) şi au propus un nou regn - *Protista,* pe care ulterior Hogg l-a denumit *Protoctista,* alături de *Plantae* şi *Animalia* .

Acest sistem de clasificare a fost ameliorat de R. Stanier, prin diviziunea regnului *Protista* în două subregnuri:

- protiste inferioare, care include microorganismele cu organizare de tip procariot (bacterii şi cianobacterii) ;
- protiste superioare, corespunzând microorganismelor eucariote şi care cuprind algele, fungii şi protozoarele.

În această clasificare, regnul *Protista* include toate microorganismele eucariote şi procariote, dar şi un număr de macroorganisme pluricelulare nediferenţiate (alge marine, bazidiomicete) .

Copeland (1938) a propus sistemul celor *patru regnuri* de clasificare a lumii vii:

1. *Regnul Monera,* în care sunt incluse bacteriile şi cianobacteriile.
2. *Regnul Protoctista,* cuprinzând organismele eucariote inferioare, cu organizare, în esenţă, unicelulară, sincitială sau multicelulară, fără diferenţiere celulară avansată (alge, fungi, mixomicete şi protozoare).
3. *Regnul Plantae* cuprinde plantele terestre şi acvatice.
4. *Regnul Animalia.*

Whittaker (1969) a propus un nou sistem de clasificare, care împarte lumea vie în 5 regnuri: *Monera, Protoctista, Fungi, Plantae, Animalia.*

Bergey a schimbat denumirea regnului Moncra, în cel de *Procaryota.*

Criteriile de grupare ale sistemului se bazeaza pe trei niveluri de organizare: procariot; eucariot unicelular; eucariot pluricelular, precum şi pe existenţa a trei modalităţi principale de nutriţie: *fotosintetică* şi secundar absorbtivă caracteristică plantelor, *ingestivă*, tipică pentru majoritarea animalelor şi *absorbtivă*, caracteristică fungilor.

În acord cu aceste principii, sistemul de clasificare a celor 5 regnuri are următoarea structură:

1. Regnul *Monera* include organisme unicelulare, cu organizare de tip *procariot*: bacterii, cianobacterii, actinomicete. Toate sunt unicelulare sau unicelular-coloniale, cu excepţia actinomicetelor, care au o organizare de tip micelial. Modul de nutriţie este *absorbtiv*, iar metabolismul este de tip foto- sau chimiosintetizant.

2. Regnul *Protoctista* cuprinde microorganismele eucariote: algele microscopice, fungii acvatici flagelaţi şi protozoarele. Limitele sale faţă de celelalte regnuri nu sunt bine precizate. Termenul de *Protoctista* este preferat celui de *Protista*, deoarece, pe lângă protozoare sunt incluse şi organisme pluricelulare (alge marine, fungi inferiori), dar datorită absenţei diferenţierii tisulare sunt mai apropiate de organismele unicelulare. Metabolismul este foto- sau chimiosintetizant, iar nutriţia este absorbtivă sau ingestivă.

3. Regnul *Fungi* cuprinde organisme eucariote imobile, ce formează spori. Din spori, prin germinare se formează *hifele*, compartimentate în celule, prin septuri transversale. O aglomerare de hife formează *miceliul*. Prezintă procese sexuale de tip conjugativ, rezultatul fiind un miceliu dicarion. Starea dicariotă este eventual urmată de fuziune, iar diploidia este tranzitorie, deoarece prin diviziuni meiotice se formează *spori haploizi*. În absenţa procesului sexual, sporii se formează pe cale asexuată la vârful unor hife specializate şi se numesc *conidii*. La germinare, sporii sexuaţi sau asexuaţi formează o hifă.

Aproape toţi fungii sunt aerobi, dar sunt heterotrofi fără excepţie. Nutriţia este de tip *absorbtiv*. Fungii secretă enzime care degradează moleculele nutritive complexe din mediul extern. Moleculele simple sunt transportate prin peretele şi membrana fungică.

4. Regnul *Plantae* este împărţit în două grupe: plante *nevasculare* (briofite) şi plante *vasculare* (trachaeofite). Ultimele au ţesuturi conducătoare (xilem şi floem). Xilemul transportă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

apa şi ionii de la rădăcini spre părţile aeriene, iar floemul transportă seva elaborată în fotosinteză, de la nivelul frunzelor, în toată planta. Plantele se dezvoltă din embrioni diploizi. Spre deosebire de animale, formate în cea mai mare parte din celule diploide şi de fungi care sunt organisme haploide sau dicariote, plantele alternează în ciclul lor de dezvoltare, generaţiile haploidă şi diploidă. Generaţia haploidă se numeşte *gametofit,* iar cea diploidă se numeşte *sporofit.* La briofite predomină faza de gametofit, iar sporofitul este mic şi cu aspect total diferit. La tracheofite, predomină sporofitul, iar gametofitul este constituit dintr-un grup de celule dependente de sporofit.

5. *Regnul Animalia* cuprinde organisme multicelulare, cu nutriţie de tip ingestiv. Celulele sunt diploide şi se dezvoltă din doi gameţi haploizi: ovulul şi spermatozoidul. După fertilizare rezultă *celula ou* diploidă, ce străbate etapele de blastulă şi gastrulă. Celulele animale sunt lipsite de perete şi de plastide, dar au o diferenţiere tisulară foarte înaltă.

Sistemele de clasificare cu 4 şi 5 regnuri scot în evidenţă heterogenitatea microorganismelor. În sistemul celor 5 regnuri, microorganismele aparţin regnurilor *Monera, Protoctista şi Fungi.*

Bacteriile se disting de celelalte organisme prin organizarea celulară de tip *procariot,* pe care Chatton a evidenţiat-o încă din 1925.

Toate sistemele moderne de clasificare rezervă bacteriilor o poziţie sistematică separată. Incadrarea lor alături de plante este "arbitrară şi nelogică" (Stanier, 1977), iar păstrarea ei în pofida numeroaselor argumente ştiinţifice care probează contrariul, este rezultatul "refuzului de a privi lucrurile în faţă".

Clasificarea microorganismelor a trecut de la criteriile morfologice, la cele celulare, iar în ultimul deceniu locul lor a fost luat de *criteriile moleculare.* Tehnica secvenţierii ADN a revoluţionat sistemele de clasificare, deoarece a făcut posibil accesul la informaţia conţinută în secvenţa ADN.

Rezultatele cercetărilor de nivel molecular au arătat ca sistemul de clasificare a lumii vii în cele 5 regnuri, nu este corect din punct de vedere filogenetic, din mai multe motive:

- cele două regnuri de microorganisme eucariote – *Protista şi Fungi* sunt artificiale;
- plantele şi animalele (*Metaphyta şi Metazoa*) au evoluat din organisme eucariote unicelulare;
- în sistemul celor 5 regnuri, diferenţele dintre *Monera (Procaryotae)* şi celelalte 4 regnuri sunt mult mai mari decat diferenţele între reprezentanţii celor 4.

O primă divizare a lumii vii trebuie să se facă intre organismele *procariote şi eucariote.*

Clasificarea lumii vii în trei domenii

Se acceptă că forma de organizare *eucariotă* însumează o multitudine de caractere comune şi defineşte o *unitate filogenetică.*

Organismele procariote nu constituie însă o unitate filogenetică, deoarece nu întrunesc caractere unitare. Ele sunt reunite în regnul *Monera,* dar le lipsesc caracteristicile unificatoare ale eucariotelor. Regnul *Monera reuneşte diviziunea Eubacteria şi Archaebacteria.* La nivel citologic, *Archaebacteria* sunt procariote, dar la nivel molecular, ele nu se aseamănă cu eubacteriile. Au chiar mai puţine asemănări cu eubacteriile, decât cu eucariotele. Din această cauză, regnul *Procaryotae* (Monera) este un taxon nevalidat de datele de ordin molecular.

Clasificarea bacteriilor pe baza criteriilor fenotipice clasice (reacţia Gram, particularităţi biochimice şi funcţionale) s-a dovedit utilă în determinările curente de laborator, dar nu a permis elaborarea unui sistem unitar de clasificare .

Filogenia bacteriană s-a conturat odată cu dezvoltarea metodelor de biologie moleculară, de secvenţiere a proteinelor şi a acizilor nucleici, molecule denumite *semantide* (Zuckerkandl şi Pauling, 1965). Cu cât secvenţele semantidelor a două organisme diferite sunt mai asemănătoare, cu atât ele sunt mai apropiate filogenetic. Acest criteriu presupune ca genele codificatoare să nu se transfere pe oriziontală, de la o celulă la alta.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La bacterii, studiul proteinelor pentru scopuri filogenetice este neadecvat, pentru că uneori, o proteină are o distribuţie limitată sau este greu de secvenţiat (Zinder, 1998). Metodele de biologie moleculară au fost orientate în primul rând asupra studiului *acizilor nucleici.* S-a determinat procentul G + C din ADN, dar testul nu este edificator, deoarece două organisme cu secvenţe diferite de ADN pot avea aceeaşi proporţie de G + C. Testul ramâne valabil pentru a caracteriza un organism nou.

Un alt test furnizat de biologia moleculară, util pentru studiul filogeniei bacteriene este *hibridarea ADN-ADN.* Metoda evidenţiază capacitatea unei secvenţe de ADN monocatenar al unui organism de a forma un heteroduplex cu ADN monocatenar de la alt organism, pe baza omologiei secvenţei de baze. Dacă deosebirile secvenţei de baze sunt mai mari de 15%, heteroduplexul nu se formează, astfel că acest test este negativ pentru organismele îndepărtate filogenetic, dar este decisiv pentru delimitarea speciei bacteriene.

În anii 70, C. Woese a iniţiat studiul secvenţei ARNr, ca un posibil marker filogenetic, folosind ARNr 16S cu lungimea 1500-1600 nucleotide, component al subunităţii mici a ribosomului. Tehnica presupune izolarea ARNr şi digestia sa cu RN-aza T_1, care clivează după fiecare rest de G. Rezultă o varietate de fragmente de oligoribonucleotide, cu lungimea de 1-25 baze, fiecare terminându-se cu G. Amestecul se separă şi se identifică prin metoda electroforezei bidimensionale. Astfel s-a evidenţiat că cianobacteriile sunt asemănătoare cu cloroplastele.

Metodologia moleculară a evidenţiat că peretele celular al archaebacteriilor conţine proteine (Kandler, 1988), dar lipseşte *mureina*, iar membrana celulară conţine lipide izoprenoidice cu *legătură eterică* (dar nu acizi graşi cu legătură esterică).

Nivelul molecular de abordare permite împărţirea lumii vii în trei sisteme primare distincte: *Eubacteria, Archaebacteria şi Eucaryotae* (Woese, 1990). Caracteristicile ARNr, ale lipidelor membranei citoplasmatice, ale ARN-polimerazei etc., sunt argumente în favoarea distincţiei nete între *Eubacteria şi Archaebacteria.* Din punct de vedere citologic, reprezentanţii ambilor taxoni aparţin tipului *procariot.* Diferenţele între *Eubacteria, Archaebacteria şi Eucaryotae* sunt mai profunde decât cele existente între regnurile tradiţionale. Toate eubacteriile au o ARN-polimerază cu o structură simplă (5 subunităţi), iar ARN-polimeraza archaebacteriilor are o structură complexă, cu cel puţin 7 subunităţi (între 7 şi 12). Eucariotele sunt unice deoarece au trei ARN-polimeraze (I- transcrie ARNr; II – transcrie ARNm; III-transcrie ARNt). Uneori, moleculele archaebacteriilor se aseamănă cu omologele lor de la eucariote, mai mult decât cu ale eubacteriilor. Pentru proteinele ribosomale, omologia dintre *Archaebacteria şi Eucariotae* nu are corespondent la *Eubacteria* (Kandler, 1993). Dar, archaebacteriile şi eucariotele sunt foarte diferite şi se disting, fiecare în parte, de eubacterii.

Woese (1990) consideră că un nou sistem filogenetic se impune cu stringenţă maximă. Acesta trebuie sa recunoască, în primul rând, cele trei tipuri fundamentale: *Eubacteria, Archaebacteria şi Eucaryotae.* Ele trebuie să aibă statutul de *domenii*, o categorie taxonomică superioară regnului. Autorul propune abandonarea denumirii de *Archaebacteria*, deoarece sugerează înrudirea strânsă cu *Eubacteria*, care în realitate nu există. Cele trei domenii se numesc *Bacteria (*sinonim *Eubacteria), Archaea şi Eucarya (*sinonim *Eucaryotae)*, care include organismele eucariote (protozoare, alge, fungi, plante, animale).

Din punct de vedere fiziologic, microorganismele *domeniului Archaea* aparţin la trei tipuri: metanogene, halofile şi sulf-dependente. Metanogenele sunt strict anaerobe şi produc gaz metan ca produs final al fermentaţiei. Cele sulf-dependente trăiesc în medii termofile şi reduc sau oxidează compuşii sulfului pentru a obţine energie sub forma potenţialului reducător. Sunt specii *aerobe şi anaerobe.* Halofilele trăiesc în medii hipersaline şi unele se protejează de lumină cu un pigment care conţine carotenoizi. Sunt *aerobe obligate.*

Din punct de vedere filogenetic, domeniul *Archaea* are două diviziuni distincte (Kandler, 1993):

- *Crenarchaeota (crenos* = izvor*)* cuprinde exclusiv microorganisme hipertermofile dependente de sulf, care îşi dobândesc energia prin reacţii de reducere a sulfului (*Thermoproteus, Pyrodictium* etc.), sau de oxidare a compuşilor cu sulf (*Sulfolobus).* Sunt răspândite în mediul marin şi în mediile vulcanice terestre;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

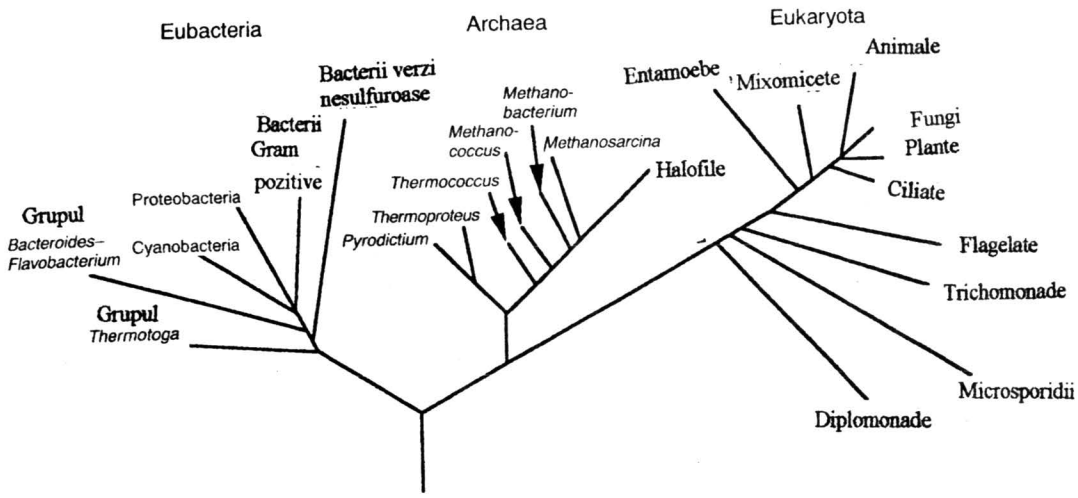


Fig. 1. Arborele filogenetic universal, bazat pe secvenţa ADNr a subunităţii ribosomale mici, care cuprinde cele trei domenii (după Woese 1991).

- *Euryarchaeota* cuprinde metanogenele chimiolitotrofe *hipertermofile* strict anaerobe ce cresc la 110 grade (*Methanopyrus)* şi metanogenele *mezofile* (din apă, sol, intestinul animalelor). Alţi reprezentanţi sunt *halofilele extreme* ce trăiesc în soluţii saturate de NaCl (*Halobacterium halobium)*, sulfat-reducătorii termofili (*Thermococcus, Pyrococcus).*

Clasificarea lumii vii în trei domenii recunoaşte independenţa filogenetică a bacteriilor (*Eubacteria)* şi reprezentanţilor *Archaea.*

Arhitectura celulară a organismelor grupate în domeniul *Archaea* se aseamănă cu cea a eubacteriilor. Moleculele componente ale celulelor *Archaea* se aseamănă, unele cu ale eubacteriilor, altele cu ale eucariotelor, dar există şi molecule specifice. De exemplu, ribosomii lor sunt de tip 70S, dar sunt rezistenţi la inhibitorii clasici ai sintezei proteinelor la eubacterii (streptomicină şi cloramfenicol), dar şi la inhibitorul sintezei proteice a eucariotelor (cicloheximida). În schimb, alungirea catenei peptidice este inhibată de toxina difterică, la fel ca la eucariote.

Genele la *Archaea* sunt organizate în operoni cistronici, asemănători cu ai eubacteriilor, iar ARN-polimeraza lor se aseamănă cu ARN-polimeraza II a eucariotelor. Transcrierea, la eubacterii este iniţiată de factori sigma, iar la *Archaea* este iniţiată de proteine care recunosc secvenţa TATA (TATA box).

Nici unul din sistemele de clasificare a lumii vii nu include *virusurile.* Ele formează un grup de entităţi infecţioase fără echivalent în lumea vie, dar au relaţii foarte strânse cu aceasta, deoarece se replică numai în substratul celular viu.

Caracteristicile distinctive ale organismelor celor trei domenii

Particularităţile lumii bacteriene au fost sesizate de F. Cohn, în perioada 1850-1875. El le-a definit ca organisme de dimensiuni microscopice, unicelulare, care se înmulţesc prin diviziune directă. Din acest motiv, F. Cohn este considerat *întemeietorul microbiologiei* ca ştiinţă. Odată cu acumularea unor date noi privind structura şi funcţiile celulei bacteriene a devenit evident că bacteriile nu formează un grup unitar. De exemplu, unele sunt mobile, având unul sau mai mulţi flageli, iar altele sunt imobile; unele sunt sporulate, altele nesporulate; majoritatea se înmulţesc prin diviziune directă, dar unele înmuguresc, iar la actinomicete

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

multiplicarea se face prin spori. Conceptul de bacterie a fost definit de R. Stanier (1960-1980), pornind de la observaţia lui Chatton (1925), după care există două tipuri distincte de organizare a lumii vii: *procariot şi eucariot.* Procariotele au fost definite în termeni pozitivi, pe baza diferenţelor de compoziţie chimică şi a funcţiilor pe care le îndeplinesc moleculele omologe ale organismelor procariote şi eucariote.

Definirea conceptuală a procariotelor, în sensul clasic elaborat de Stanier, deşi a dominat gândirea microbiologică circa 3o de ani, nu mai corespunde realităţii ştiinţifice, deoarece nu cuprinde toate procariotele.

Descoperirea organismelor procariote, grupate în domeniul *Archaea* a invalidat conceptul clasic de "bacterie", bazat pe particularităţi biochimice şi funcţionale discriminatorii, în raport cu celula eucariotă. Microorganismele *Archaea*, deşi structural sunt procariote, la nivel molecular se disting uneori foarte net de eubacterii şi au mai multe asemănări cu eucariotele decât cu eubacteriile.

Conceptul clasic de procariot (sau de bacterie) elaborat pe baza unor caractere discriminatorii de tipul "totul sau nimic" a creat şi a întreţinut ideea unei discontinuităţi evolutive greu de explicat între procariote şi eucariote. Descoperirea grupului *Archaea* creează o punte de legatură între tipul de organizare procariotă şi eucariotă (Woese, 1994), permiţând elaborarea unui arbore filogenetic comun, al organismelor procariote şi eucariote.

Caracterele structurale şi funcţionale ale eubacteriilor, Archaea şi eucariotelor

Caracter	*Eubacterii*	*Archaea*	*Eucariote*
Dimensiuni	Câţiva µm	Câţiva µm	Celule mult mai mari (zeci de um). Unele eucariote sunt unicelulare
Perete celular	Prezent constant(cu excepţia micoplasmelor). Conţine un peptidoglican(mureina), totdeauna cu acid muramic.	Conţine proteina denumită pseudomureină fără acid muramic. Lipseşte la *Thermoplasma.*	Lipseşte la celulele animale. La cele vegetale conţine celuloză, iar la fungi conţine chitină.
Membrana plasmatica	Permeabilitate foarte selectivă (pentru apă şi molecule cu diametrul mai mic de o,8 nm), pentru enzimele degradative şi pentru fragmente mici de ADN. Nu fac endocitoză sau exocitoză. Lipsesc sterolii (cu excepţia micoplasmelor). Lipidele sunt *esteri* ai acizilor graşi cu glicerolul.	Idem Lipidele au legături *eter* între glicerol şi catenele de C. Au catene izoprenoidice ramificate cu metil. Unele lipide sunt tetraeteri.	Are o plasticitate accentuată. Celula face endocitoză prin fagocitoză sau pinocitoză. Sterolii sunt prezenţi constant.
Citoplasma	Este într-o permanentă stare de gel, necesară menţinerii integrităţii structurii materialului nuclear. Lipsesc membranele interne. Curenţii citoplasmatici sunt absenţi. Dimensiunile mici ale celulei uşurează difuzia substanţelor nutritive şi de catabolism.	Idem	Transformări reversibile sol-gel. Prezintă curenţi citoplasmatici.
Membrane intracito-plasmatice	Absente. Membrana poate trimite invaginări la nivelul cărora se desfăşoara activităţi respiratorii	Idem	Au organite delimitate de o membrană cu o structură tri-laminară de "unit membrane".
Organite care conţin ADN	------	-------	Mitocondrii, cloroplaste
Citoschelet	----------	--------	Prezent

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Organite de locomoţie	Flagelul cu structură simplă, format din molecule de flagelină, aşezate după o simetrie helicală. Flagelul este pus în mişcare de un motor rotativ situat între perete şi membrana. Energia de mişcare este produsă de un gradient protonic de o parte şi de alta a membranei	Idem	Accesorii. Dacă există sunt cili sau flageli de tip eucariot, cu o structură complexă de 2 x 9 + 2 tubuli.
Tipul de diviziune	Diviziunea este simplă (directă). Rareori are loc o diviziune asimetrică prin înmugurire. Bacteriile filamentoase suferă diviziuni multiple prin segmentare sau fragmentare.	Idem	Diviziunea este indirectă, cu aparatul mitotic şi fazele caracteristice.
Cromosomi	Un cromosom circular ce conţine 0,6-12x10^6 perechi de baze. Material genetic accesoriu (plasmide)	Un cromosom circular cu 1-4 x 10^6 baze perechi şi plasmide.	Un număr constant de cromosomi, cu caracter de specie. ADN este asociat cu proteine histonice. În mitocondrii şi cloroplaste, ADN dublu catenar circular nu conţine histone.
Nucleul	Un echivalent nuclear denumit *nucleoid* cu aspect de masă fibrilară, nedelimitată de membrană, ce corespunde cromosomului bacterian. Absenţa membranei delimitante a materialului genetic este particularitatea fundamentală a organizării celulare de tip procariot.	Idem	Nucleu tipic, cu nucleol.
Distribuţia materialului genetic după diviziune	Cromosomul este legat fizic de mezosom	Idem	Prin intermediul aparatului mitotic
Ribosomi	70 S	70 S	80 S. În mitocondrii şi cloroplaste sunt ribosomi 70 S.
Introni	Absenţi	Prezenţi în genele ce codifică ARNr şi ARNt. Genele ce codifică proteinele sunt continui.	Prezenţi în genele ce codifică proteinele, ARNr şi ARNt.
Sensibilitatea ribosomilor la streptomicină şi cloramfenicol	+	–	–
Sensibilitatea ribosomilor la cicloheximidă	–		–
Sensibilitatea ribosomilor la toxina difterică	–	+	+
Aminoacidul iniţiator al catenei polipeptidice	N-formyl-metionina	Metionina	Metionina

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Structura ARN-polimerazei	Simplă (5 subunităţi)	Complexă (minimum 7 subu- nităţi).	Idem
Operoni	+	+	-
Iniţierea transcrierii	Factorul sigma	Proteina care se leagă de secvenţa TATA	Idem
Temperatura maximă de creştere	95 grade	110 grade	60 grade
Sinergonul respirator şi fotosintetic	Sinergonul se defineşte ca un ansamblu de enzime ce funcţionează coordonat pentru realizarea unei căi metabolice. Cele două sinergoane sunt neîmpachetate, sediul lor structural fiind membrana plasmatică. De aceea, cele două funcţii sunt interrelate, modificarea uneia antrenând modificarea celeilalte	Idem	Cele două funcţii au sedii diferite şi se desfăşoară independent. Sinergonul respirator este localizat în mitocondrii, iar cel fotosintetic în cloroplaste.
Formarea endosimbionţilor	Nu adăpostesc niciodată endosimbionţi	Idem	Înglobează frecvent celule pe care le păstrează ca endosimbionţi
Capacitatea de a forma organisme multicelulare	Absentă. Sunt organisme unicelulare. Uneori formează asociaţii coloniale, dar totdeauna fiecare celulă îsi pastrează individualitatea structurală şi funcţională. Prin diviziune reface asociaţia.	Idem	Uneori, celula eucariotă constituie organisme unicelulare, dar de cele mai multe ori formează organisme multicelulare.
Capacitatea de diferenţiere celulară	Foarte rară şi limitată la structuri de rezistenţă (sporul şi echivalentul sau – chistul). Fac excepţie mixobacteriile, care au ciclu de dezvoltare şi capacitate de diferenţiere	Absentă	Foarte marcată
Mecanisme de transfer genetic	Sunt heterospecifice. Transferul informaţiei genetice se face între specii şi chiar între genuri diferite. Informaţia genetică este într-o permanentă mobilitate, ceea ce face dificilă definirea speciei bacteriene.	Idem	Fuziunea gameţilor este intraspecifică.

Tipuri morfologice de bacterii

Anatomia bacteriană studiază forma celulelor, ultrastructura şi structura moleculară a diferitelor organite celulare, în strânsă corelaţie cu funcţiile pe care le îndeplinesc.

Forma celulelor bacteriene este controlată genetic şi se realizează în mare măsură prin intermediul peretelui care conferă celulei un grad de rigiditate şi prin aceasta, forma tipică. Peretele celular este rigid, dar în acelaşi timp suplu şi elastic, adică este deformabil.

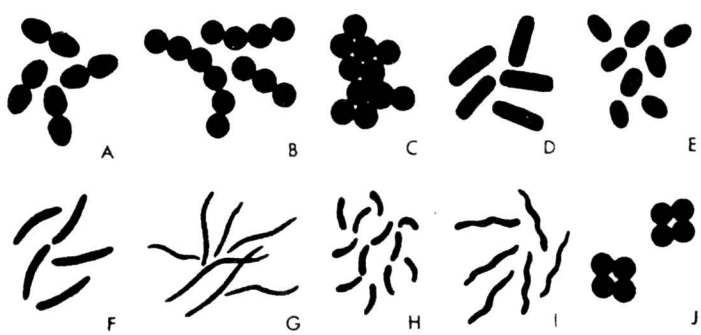


Fig. 2. Tipuri morfologice de bacterii: A = diplococi; B = streptococi; C = stafilococi; D = bacili; E = cocobacili; F = bacili fusiformi; G = forme bacilare filamentoase; H = vibrioni; I = spirili; J = sarcina.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Datorită elasticităţii sale, forma celulei bacteriene, în diferite condiţii de mediu, are tendinţa să varieze între anumite limite, însă forma tipică a celulelor unei populaţii rămâne dominantă.

Celulele bacteriene aparţin următoarelor tipuri morfologice:

- forma *sferică* (sferoidală) denumită *coc* (*coccus*, latin = sămânţă). Celulele sunt izodiametrice. După modul de grupare se disting următoarele subtipuri:

cocul simplu (celule solitare)
diplococ (celule perechi)
streptococ (celule aşezate în lanţ, *streptos* = lanţ)
tetracoc (tetradă)
sarcina (două tetrade suprapuse)
stafilococ (*staphylos* = ciorchine)

La diplococi şi streptococi, diviziunile celulare se succed după un singur plan. La alţi coci (*Pediococcus, Thiopedia, Lampropedia, Deinococcus*), prin diviziuni succesive se formează grupări de 4 celule aranjate în tetrade bidimensionale. Ulterior se formează tablete de formă pătrată, de 16-64 celule, ceea ce denotă existenţa a două planuri de diviziune, perpendiculare unul pe celălalt şi care se succed alternativ. La *Sarcina* şi la *Synechocystis*, după trei diviziuni celulare rezultă 8 celule aranjate în pachete tridimensionale cuboide. Diviziunile se succed după toate cele trei planuri ale spaţiului, fiecare perpendicular pe celelalte două.

- forma *bacilară* (*bacillus*, latin = bastonaş). Diametrul mare (lungimea) depăşeşte de câteva ori pe cel transversal. Extremităţile celulei sunt rotunjite sau tăiate în unghi drept. Se disting mai multe subtipuri morfologice, în funcţie de modul de grupare a celulelor:

cocobacil, o forma intermediară între coc şi bacil
diplobacil
streptobacil
rozetă (stea)
palisadă
litere chinezeşti

- forma *spiralată*, cu câteva subtipuri:

vibrion
spiril
spirochetă

La spirili, spirele sunt rigide şi puţinc, iar la spirochete sunt laxe şi numerose.

Celulele unei populaţii bactericne unitare, teoretic aparţin aceluiaşi tip morfologic, dar frecvent apare un *polimorfism*, mai accentuat în mediile naturale (apă, sol, tractul digestiv). Morfologia celulelor este mai uniformă în culturile bacteriene în *vitro*, dar se modifică în cursul evoluţiei unei populaţii celulare. De aceea, pentru a evita confuziile, descrierile morfologice, considerate tipice pentru o populaţie bacteriană, se referă la celulele cultivate în laborator pe medii *optimale* (medii care conţin toate substanţele necesare creşterii celulelor), în condiţii adecvate de temperatură, pH, grad de aerare.

Deoarece în culturile bacteriene îmbătrânite, apar frecvente forme de involuţie, cu morfologie atipică, forma caracteristică a celulelor unei specii este aceea a *celulelor tinere*, dintr-o cultură bacteriană aflată la sfârşitul perioadei de multiplicare.

Bacteriile care se abat de la tipurile morfologice esenţiale sunt mai rare. Astfel se disting: bacterii pătrate, bacterii prostecate, bacterii cu apendice acelulare, bacterii cu trichoame (filamentoase), bacterii miceliene.

Bacterile *pătrate*, au fost descrise de Walsby (1980) în apele hipersaline din peninsula Sinai. Pe secţiune au aspect de lentilă biconcavă, datorită conţinutului foarte mic de apă. Din această cauză, presiunea internă a celulei este practic nulă. Nu se exercită presiune asupra

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

învelişurilor celulare. Pentru ele s-a propus denumirea de gen *Quadra* şi aparţin archaebacteriilor

Bacteriile prostecate (prosteca = apendice, coadă, anexă, adaus). Caracteristica structurală este existenţa *prostecii*, o prelungire semirigidă în continuarea celulei, cu diametrul mai mic decât al celulei mature. Prosteca este o prelungire celulară, ceea ce o deosebeşte de structurile apendiculare acelulare.

Se disting două categorii de bacterii prostecate: bacterii pedunculate (de exemplu, *Caulobacter*); bacterii prostecate care *înmuguresc* (de exemplu, *Hyphomicrobium*).

Bacteriile cu *apendice acelulare* (de exemplu, *Gallionella*) sunt reniforme. De pe faţa concavă porneşte un apendice acelular lung, format dintr-un produs de secreţie a celulei.

Bacteriile ce formează *trichoame* (de exemplu *Beggiatoa, Sphaerotilus*) au aspectul unui filament multicelular, în care celulele vin în contact prin extremităţile lor şi sunt acoperite de un înveliş parietal comun.

Bacteriile *miceliene* (*actinomicete*, iar denumirea nouă este aceea de *actinobacterii*) au un aparat vegetativ reprezentat de micelii fine, ramificate, cu organizare procariotă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

STRUCTURA ŞI FUNCŢIILE CELULEI BACTERIENE

Cunoaşterea structurii interne a celulei bacteriene este rezultatul utilizării tehnicilor de citochimie şi de microscopie electronică. Tehnicile de citochimie presupun utilizarea unor metode de colorare selectivă, adică a coloranţilor cu afinitate pentru o anumită structură celulară. Astfel s-a demonstrat structura şi arhitectura moleculară a componentelor celulare. Prin arhitectură moleculară se înţelege modalitatea de aranjare ordonată a moleculelor constitutive ale unei structuri.

Structura reper a celulei bacteriene este *peretele celular*. În raport cu peretele, se disting structurile *intraparietale* (care alcătuiesc protoplastul bacterian) şi structurile *extraparietale*.

Structurile intraparietale sunt:

- spaţiul periplasmic
- membrana plasmatică
- mezosomul
- citoplasma
- ribosomii
- incluziile
- vacuolele
- sporul
- aparatul fotosintetic
- rhapidosomii (*rhapidos* = baston) – incluzii ribonucleoproteice în formă de baston
- magnetosomii – incluzii de magnetită.

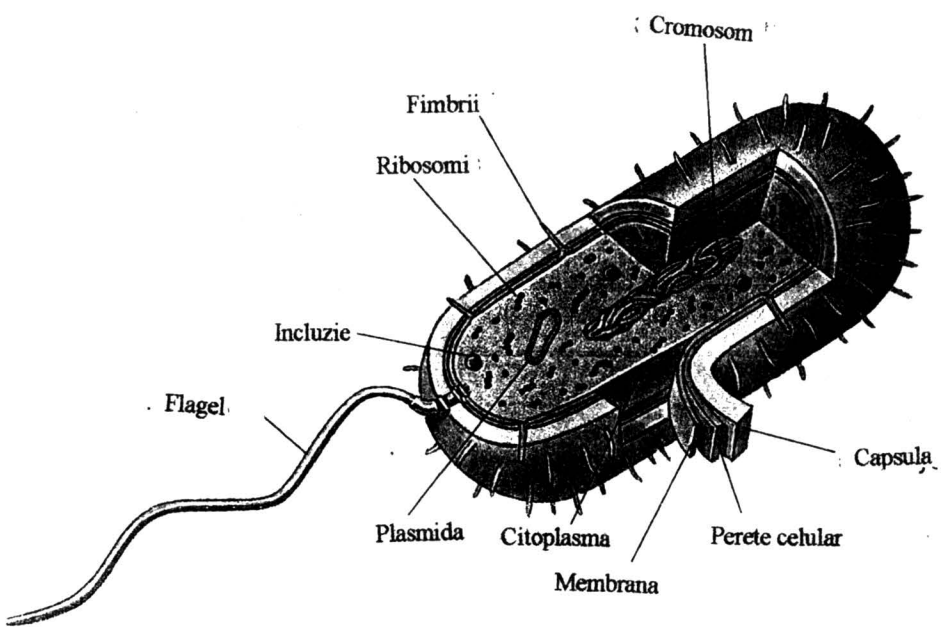


Fig. 3. Diagrama organizării unei celule procariote (un bacil cu flagel polar) (după Black, 1996).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Structurile extraparietale sunt reprezentate de;

- glicocalix
- flageli
- fimbrii şi pili
- spini – structuri pericelulare groase la bază şi ascuţite la vârf.

Unele structuri (membrana, citoplasma, nucleoidul, ribosomii) sunt *esenţiale* (obligatorii) şi se găsesc la toate celulele bacteriene. Altele sunt *facultative* (spor, aparat fotosintetic, capsulă, flageli), fiind prezente la anumite grupe de bacterii.

Peretele celular

Peretele celular este o structură rigidă de înveliş, care înconjură complet celula bacteriană. La cele mobile, peretele este străbătut de flageli. Structura parietală lipseşte la bacteriile din grupul *Mycoplasma*, precum şi la cele halofile extreme (cele care trăiesc în medii saline foarte concentrate, unde structura protectoare faţă de şocul osmotic nu este necesară).

Evidenţiere. La microscopul optic, peretele celular se evidenţiază după colorare selectivă, cu coloranţi de mare afinitate faţă de componentele sale chimice. La microscopul electronic, peretele se evidenţiază fie direct, fie după utilizarea unor artificii de tehnică, ce constau în lezarea mecanică a structurii parietale cu perle de sticlă sau cu ultrasunete. Conţinutul celular se pierde şi peretele rămâne ca un sac gol şi rigid, care păstrează forma originală a celulei, ceea ce sugerează rolul esenţial al peretelui în determinarea formei bacteriene.

Grosimea peretelui este cuprinsă între 15-30 nm (uneori până la 80 nm).

În ciuda stării incerte a taxonomiei bacteriene, un criteriu empiric care a avut o valoare practică deosebită în clasificarea şi identificarea procariotelor, este răspunsul la coloraţia Gram (C. Gram, 1884). Aşa cum afirmă Murray, caracterul Gram pozitiv sau Gram negativ este indiscutabil, cu excepţia archaebacteriilor, cocilor rezistenţi la radiaţiile ionizante şi a micoplasmelor.

În funcţie de particularităţile structurale ale peretelui, bacteriile se împart în 4 categorii:

1. *Firmacutes* (*firmus* = tare; *cutis* = înveliş) sunt bacteriile Gram pozitive, cu perete celular gros şi rigid, la care mureina reprezintă până la 80% din greutatea uscată a acestei structuri.

2. *Gracilicutes* (*gracilis* = subţire, fin) sunt bacteriile Gram negative cu perete subţire, la care mureina reprezintă circa 10% din greutatea uscată a peretelui.

3. *Mollicutes* sau *Tenericutes* (*mollis, tener* = moale) cuprinde bacteriile din grupul *Mycoplasma*, lipsite de perete. Periferia celulei este acoperită de o membrană ce conţine *steroli*, cu rol protector faţă de liza osmotică. Sunt cele mai mici bacterii cunoscute, cu capacitatea de a creşte pe medii inerte. Se dezvoltă ca saprobionte în cavităţile organismului uman şi animal sau sunt patogene pentru om, animale şi plante.

4. *Mendosicutes* (*mendosus* =o structură cu defecte). Noţiunea desemnează organismele domeniului *Archaea*, care au perete celular din care lipseşte mureina.

Marea majoritate a bacteriilor cunoscute, aparţin grupului Gram pozitive sau Gram negative.

Structura moleculară a peretelui la bacteriile Gram pozitive

La bacteriile Gram pozitive, peretele celular este gros, rezistent şi rigid. Componenta esenţială este *mureina*, denumită încă şi *peptidoglican, glicopeptid, mucopeptid sau glucozaminopeptid*. Mureina formează un strat rigid, adiacent membranei plasmatice şi sub aspectul compoziţiei chimice este unitară la toate eubacteriile (Gram pozitive şi Gram negative).

Mureina este alcătuită dintr-o componentă *peptidică* şi una *glucidică*. Componenta glucidică de bază este un dizaharid format din *N-acetil-D-glucozamină şi acid N-acetilmuramic*, legate beta 1-4. Acidul N-acetilmuramic rezultă prin stabilirea unei legături ester între N-acetil-D-glucozamină şi acidul lactic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

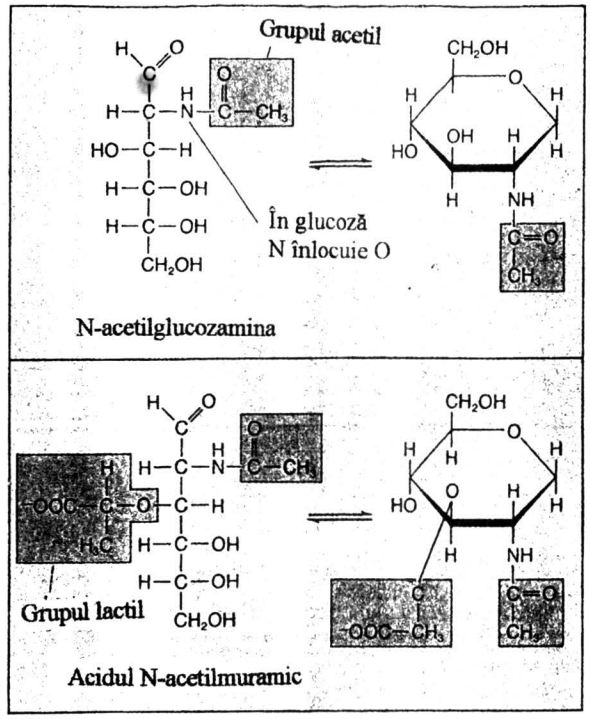


Fig. 4. Derivaţii glucidici cei mai comuni în structura peretelui bacterian: N-acetilglucozamina şi acidul N-acetilmuramic.

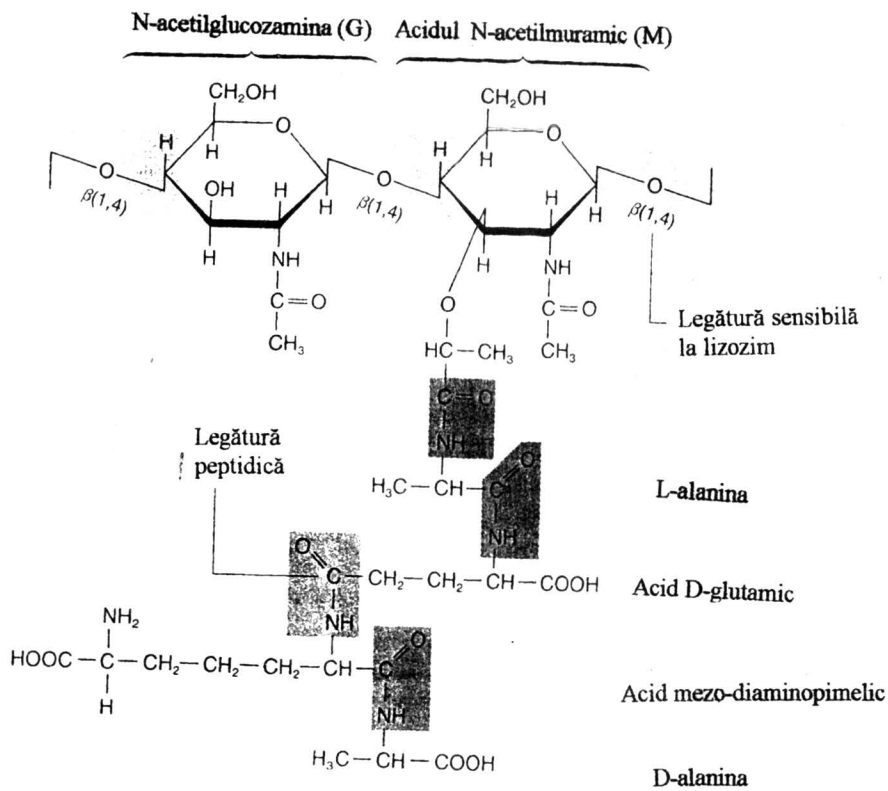


Fig. 5. Structura glicanului tetrapeptidic, una din unităţile repetitive ale peptidoglicanului structurii parietale. Această structură chimică se găseşte la *E. coli*, dar alte bacterii conţin alţi aminoacizi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Componenta *peptidică* este un tetrapeptid, a cărui compoziţie în aminoacizi este variabilă în funcţie de specie, dar conţine L-alanină, acid D-glutamic, acid diaminopimelic (derivat al lizinei) sau lizina şi D-alanina şi se leagă de acidul N-acetilmuramic. Acidul N-acetil muramic şi D-aminoacizii sunt markeri biochimici ai eubacteriilor.

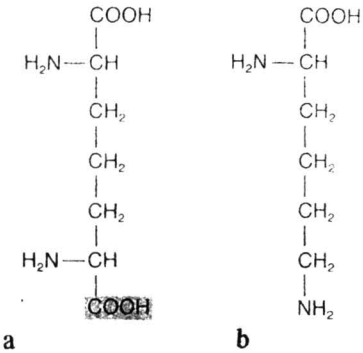


Fig. 6. (a) Acidul diaminopimelic, derivat al lizinei (b).

Rigiditatea peptidoglicanului este conferită de punţi peptidice transversale. Cu cât numărul de legături peptidice este mai mare, cu atât creşte rigiditatea sa.

La bacteriile Gram negative, punţile transversale reunesc gruparea NH_2 a acidului diaminopimelic, cu gruparea COOH a D-alaninei terminale a altei grupări peptidice.

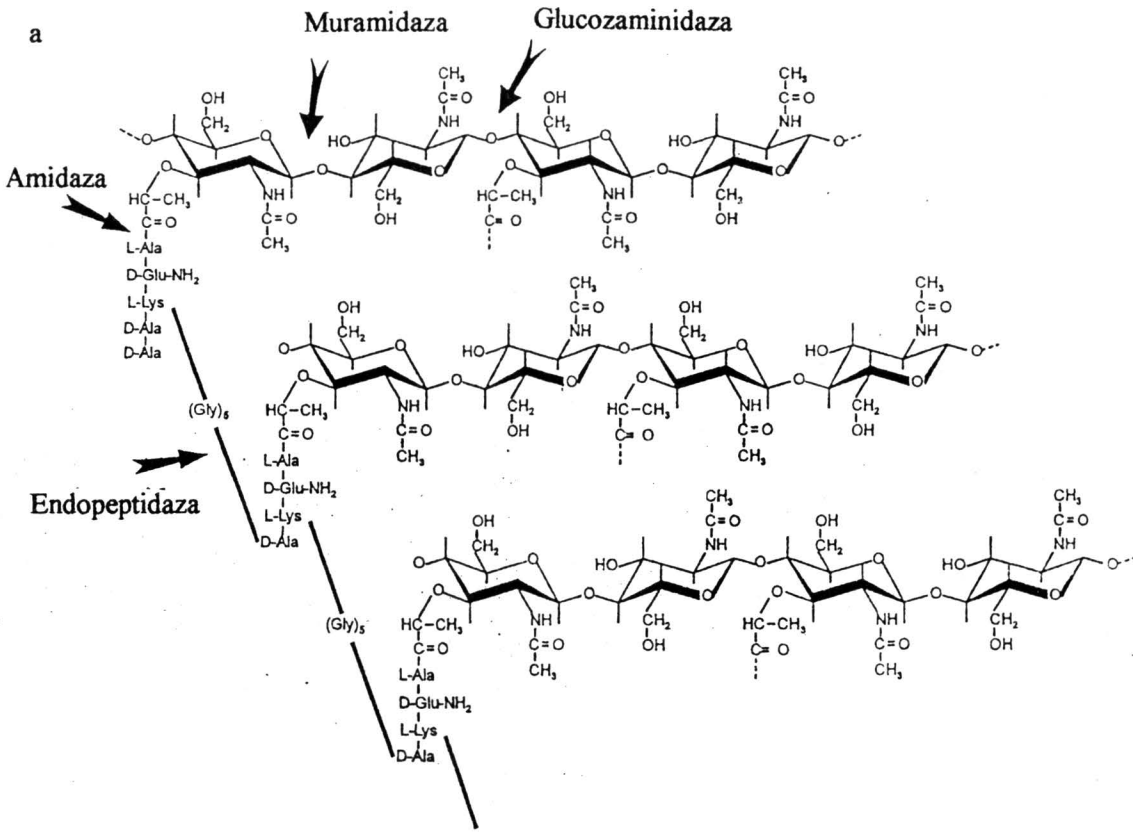


Fig. 7 a. Structura chimică generală a peptidoglicanului. Săgeţile indică situsurile la care peptidoglicanul poate fi atacat de hidrolazele peretelui celular. Sunt prezentate trei catene de peptidoglican ce constau din resturi alternante de acid N-acetil muramic şi N-acetilglucozamină. Tetrapeptidele legate de acidul N-acetilmuramic sunt interconectate prin punţi de pentaglicină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

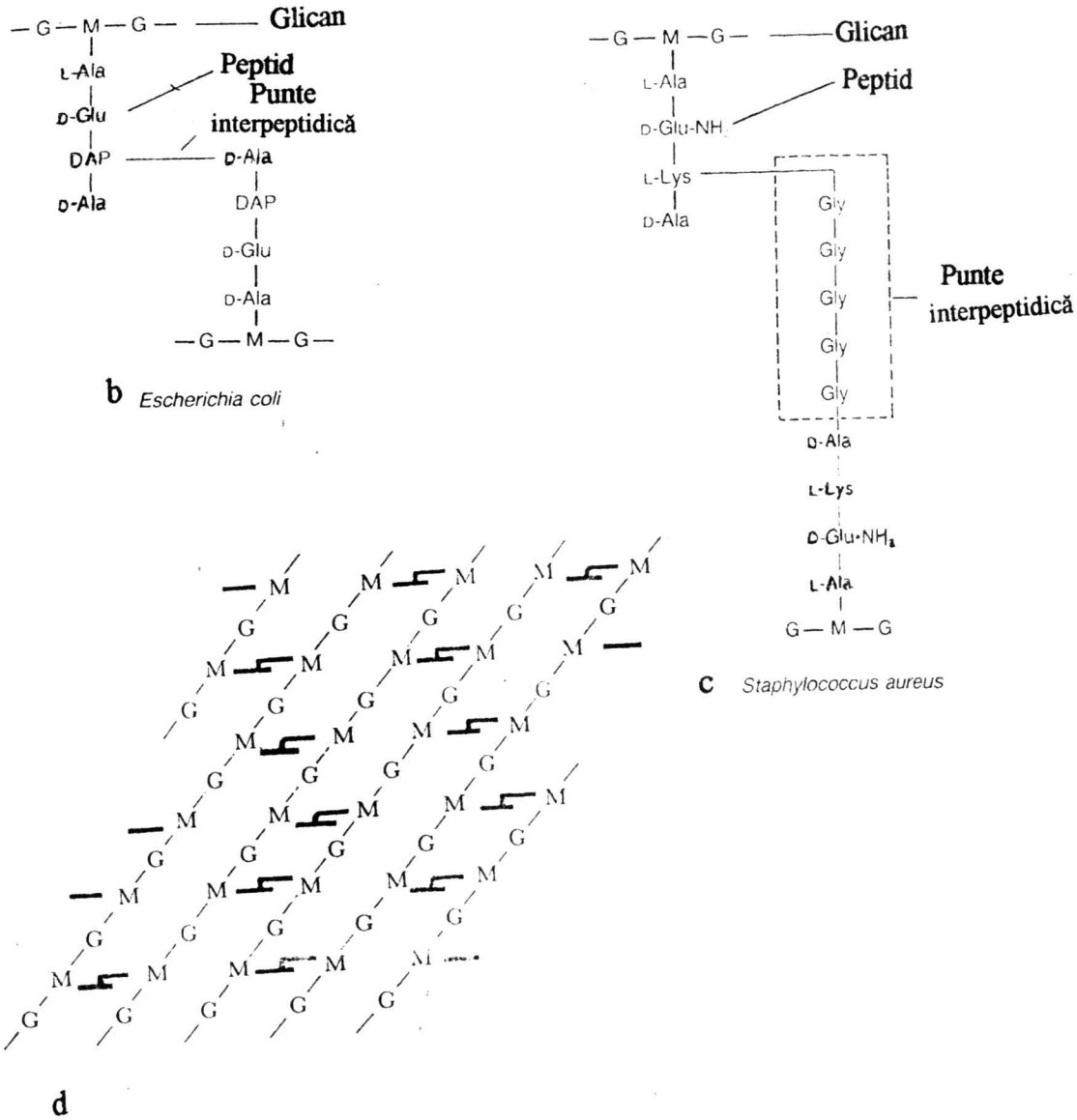


Fig. 7 b, c, d: (b) La *E. coli*, conexiunea tetrapeptidelor este directă. (c) La *S. aureus*, tetrapeptidele sunt conectate prin punţi de pentaglicină. (d) Reprezentarea structurii generale a peptidoglicanului (G = N-acetil-glucozamina; M = acidul N-acetilmuramic). Liniile groase reprezintă legături peptidice transversale (după Brock, 1988).

La bacteriile Gram pozitive, legarea transversală a două peptide învecinate se face printr-o punte peptidică, care la *S. aureus* este formată din resturi de glicină. Se formează astfel o structură covalentă perfect continuă în jurul celulei, o moleculă mureinică gigantă, un adevărat *sac mureinic*, cu structură tridimensională dinamică.

Importanţa mureinei, ca element structural esenţial al peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive, a reieşit din studiul acţiunii a doi agenţi antibacterieni: lizozimul şi penicilina.

Lizozimul clivează legăturile glicozidice beta 1-4 ale mureinei, iar penicilina inhibă treapta terminală a biosintezei mureinei (reacţia de transpeptidare). Lizozimul hidrolizează mureina celulelor aflate în faza staţionară, iar penicilina inhibă celulele bacteriene aflate în faza de creştere.

La nivelul sacului mureinic sunt localizate enzimele care modelează creşterea sa: murein-hidrolazele atacă legăturile chimice ale mureinei, iar murein-sintetazele inseră noi unităţi de construcţie. Peptidoglicanii diferitelor specii diferă prin aminoacizii 2 şi 3 ai tetrapeptidului şi prin frecvenţa punţilor transversale de pentaglicină. Speciile patogene au o

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

frecvenţă superioară a punţilor transversale, ceea ce se corelează cu o rezistenţă mai mare a mureinei la acţiunea factorilor litici din umorile organismului (lizozimul etc.).

Mureina formează o matrice în care se găsesc alţi polimeri: polizaharide, acizi teichoici.

Acizii teichoici sunt molecule lungi şi flexibile. Din punct de vedere chimic sunt polimeri de 1-3-poliglicerol-fosfat sau de poli-ribitol-fosfat, legaţi fosfo-diesteric. Polimerii formează axul central al moleculei. Grupările –OH libere ale glicerolului şi gruparea $-OH\ C_3$ a ribitolului sunt ocupate de D-alanină, D-glucoză sau de N-acetilglucozamină.

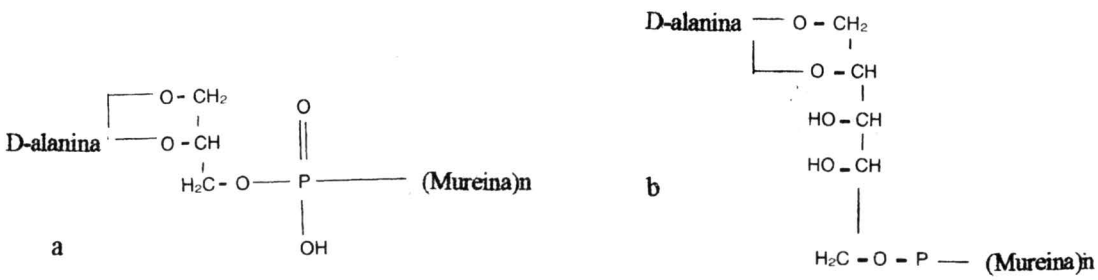


Fig. 8. Structura chimică a acizilor teichoici : a. Acidul glicerol-teichoic ; b. Acidul ribitol-teichoic.

Bacteriile Gram pozitive au două categorii de acizi teichoici: a) *acizi lipoteichoici* sau membranari, care traversează peptidoglicanul şi cu o extremitate se leagă de glicolipidele din membrană, iar celălalt capăt este liber la suprafaţa celulei; b)*acizi teichoici parietali*, ataşaţi de resturile de acid N-acetilmuramic ale mureinei.

Acizii teichoici sunt structuri moleculare filamentoase, care conferă un plus de rigiditate peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive. Pentru bacteriile patogene, acizii teichoici sunt un factor de virulenţă, deoarece au proprietăţi chimiotactic negative faţă de fagocite. Sunt implicaţi în transportul ionilor în/şi din celulă. Pot avea rolul de receptori de fagi. Uneori bacteriile secretă cantităţi mari de acizi teichoici solubili.

Peretele celular la bacteriile Gram negative

La bacteriile Gram negative, mureina reprezintă numai 2,5-10% din greutatea uscată a peretelui. Peretele lor este mai complex, datorită unei structuri caracteristice denumită *membrana externă* a peretelui celular, o replică structurală a membranei plasmatice, care poate fi astfel considerată ca *membrană internă*.

La microscopul electronic, peretele celular apare pluristratificat, datorită structurii trilaminare a membranei externe a peretelui.

Mureina este localizată în stratul cel mai intern al peretelui. După un tratament adecvat, membrana externă se poate îndepărta şi se obţine sacul mureinic pur, extrem de fin, care păstrează forma originală a celulei şi care sugerează că mureina ar putea fi o reţea bidimensională (un monostrat molecular), în timp ce la bacteriile Gram pozitive cantitatea de peptidoglican corespunde la 2o de straturi moleculare sau mai mult.

Membrana externă a peretelui conţine fosfolipide (35% din greutate), proteine (15%) şi lipopolizaharide (50%).

Lipoproteinele leagă ferm membrana externă, de peptidoglicanul profund.

Lipopolizaharidele (LPS) sunt inclavate în membrana externă. Ele sunt de fapt *endotoxinele* bacteriilor Gram negative (*Salmonella, Shigella, Escherichia etc.)*. Se numesc *endotoxine*, deoarece se eliberează numai după pierderea integrităţii celulei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

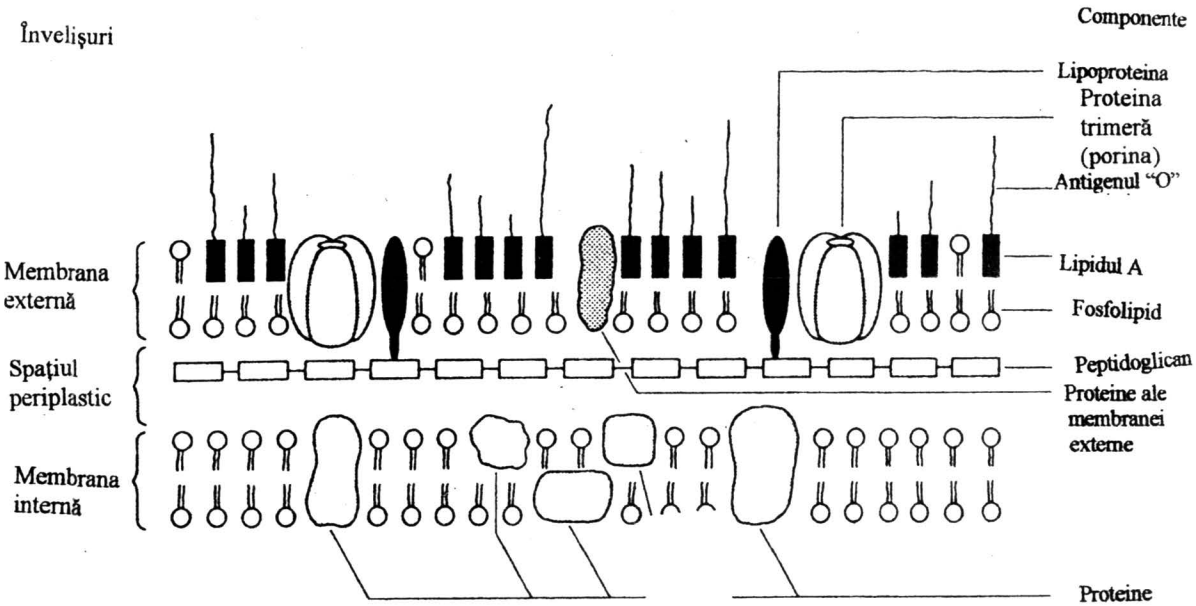


Fig. 9. Reprezentarea schematică a structurii moleculare a peretelui la bacteriile Gam negative. Proteinele trimere matriceale din membrana externă sunt asociate cu lipoproteine şi cu lipopolizaharide (LPS). LPS sunt legate covalent de peptidoglican (după Davis, 1990).

Din punct de vedere chimic, LPS sunt molecule complexe, fiind alcătuite dintr-o fracţie lipidică şi una polizaharidică.

Datorită poziţiei lor externe, LPS se pot extrage din celule, cu fenol 45-60%.

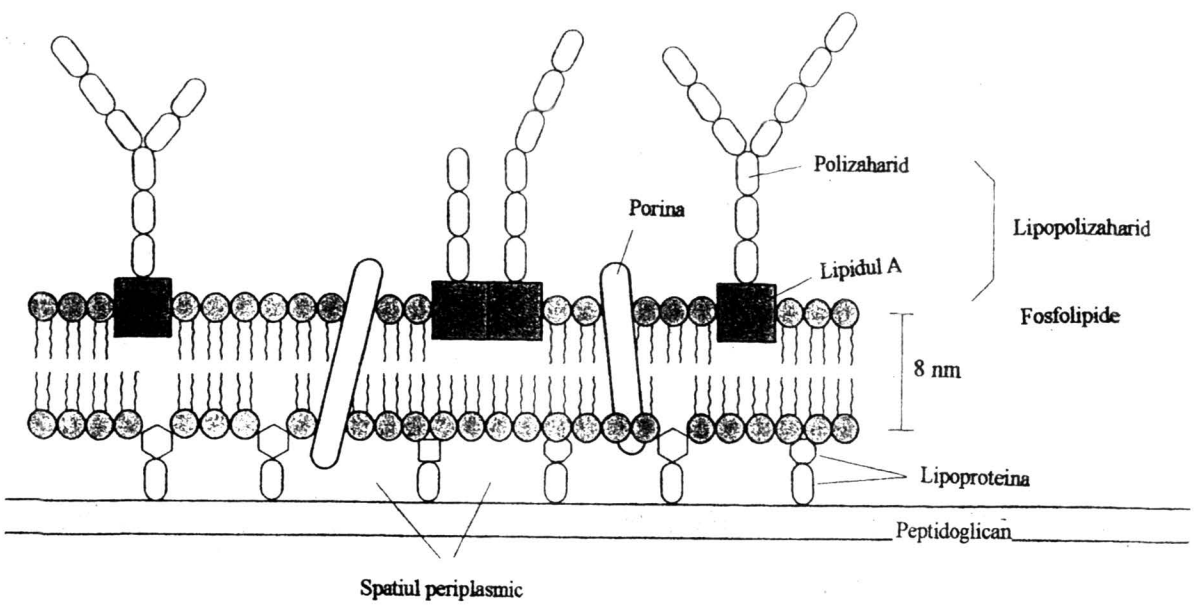


Fig. 10. Raporturile macromoleculelor componente ale peretelui celular la *Salmonella* (după Brook, 1988).

Din punct de vedere structural, molecula LPS are trei regiuni:

- o regiune *polizaharidică externă* (polizaharidul O)
- o regiune *oligozaharidică intermediară* (regiunea R)
- o regiune internă hidrofobă, denumită *lipidul A*, prin care LPS se ancorează în membrana externă, printre moleculele fosfolipidice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Regiunile intermediară şi internă ale moleculei LPS au compoziţie chimică relativ constantă la diferite specii de bacterii Gram negative.

Polizaharidul regiunii externe are o structură şi o compoziţie chimică foarte variabile şi constituie antigenul somatic O, cu specificitate antigenică foarte înaltă, pe baza căruia numeroasele tulpini ale unei specii aparţin unui mare număr de *serotipuri*.

Lipidul A este legat covalent de oligozaharidul regiunii intermediare. La *Salmonella*, lipidul A este alcătuit din dizaharide de D-glucozamină, legate beta 1'-6. Perechile de D-glucozamină sunt interconectate 1-4', prin punţi pirofosfat.

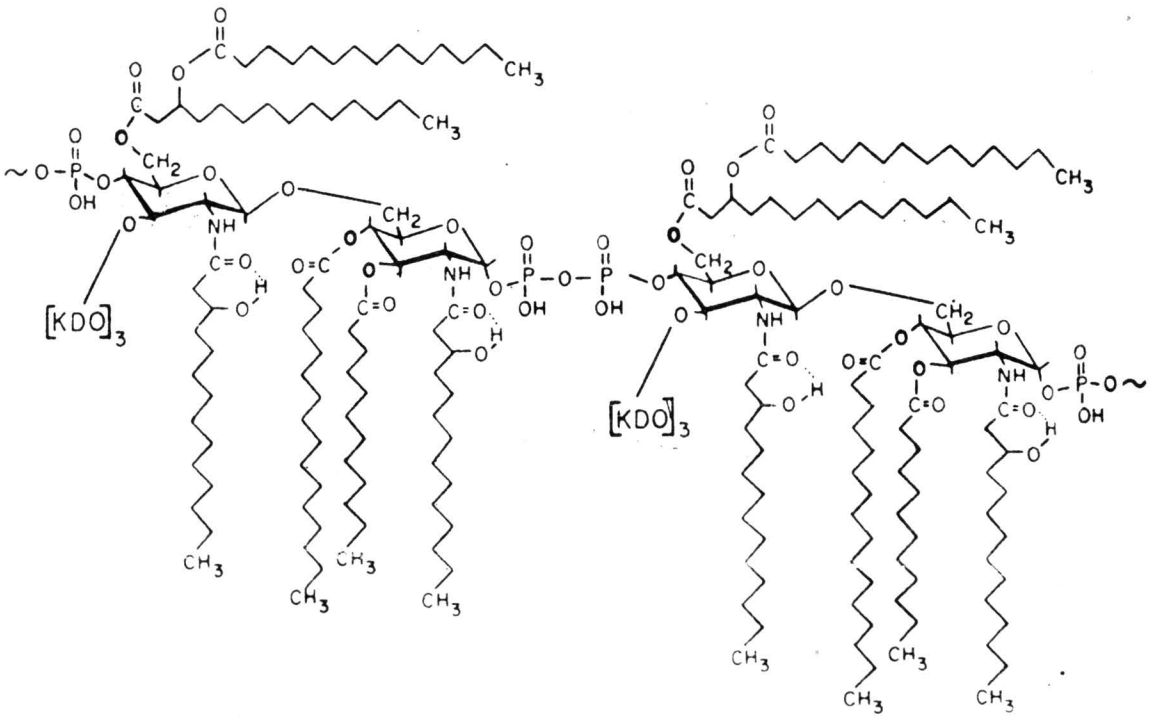


Fig. 11. Structura lipidului A al lipopolizaharidului de *Salmonella*, cu trizaharidul KDO şi cu resturile de acizi graşi.

Grupările –OH din poziţiile 3, 4 şi 6' ale fiecărui dizaharid sunt substituite de acizi graşi (lauric, palmitic, miristoximiristic, hidroximiristic).

Grupul –OH din poziţia 3 se leagă de componenta polizaharidică (acidul 2-ceto, 3-deoxioctanoic)(KDO).

Grupările -NH_2 ale glucozaminei sunt substituite de acidul D-3-hidroximiristic .

Lipidul are proprietăţi endotoxice, evidenţiate la mutantele R care sintetizează LPS incomplet, căruia îi lipseşte polizaharidul O şi unele componente ale oligozaharidului regiunii intermediare R.

Relaţia dintre structura peretelui celular şi coloraţia Gram este următoarea: tehnica implică tratamentul succesiv al celulelor cu cristal-violet (un colorant bazic), urmat de tratamentul cu soluţie de iod şi ulterior, extracţia cu un solvent organic polar (alcool sau acetonă). În celulă, cristal-violetul şi iodul formează un complex insolubil. Celulele care rezistă etapei decolorării şi reţin complexul insolubil (cristal violet-iod) albastru închis sunt celule Gram pozitive, iar cele care nu reţin colorantul sunt Gram negative

Reacţia Gram nu se corelează direct cu compoziţia chimică a peretelui, ci depinde de structura sa fizică, de starea fiziologică a celulei, de integritatea ei structurală. Astfel, levurile, deşi au perete celular gros, dar cu o compoziţie chimică diferită de a mureinei, se colorează Gram pozitiv.

La *Archaea*, peretele celular prezintă diferenţe structurale majore, comparativ cu ale eubacteriilor. Diferitele specii de *Archaea* se colorează Gram pozitiv sau Gram negativ. Peretele lor nu conţine acid muramic sau D-aminoacizi, markeri biochimici ai mureinei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

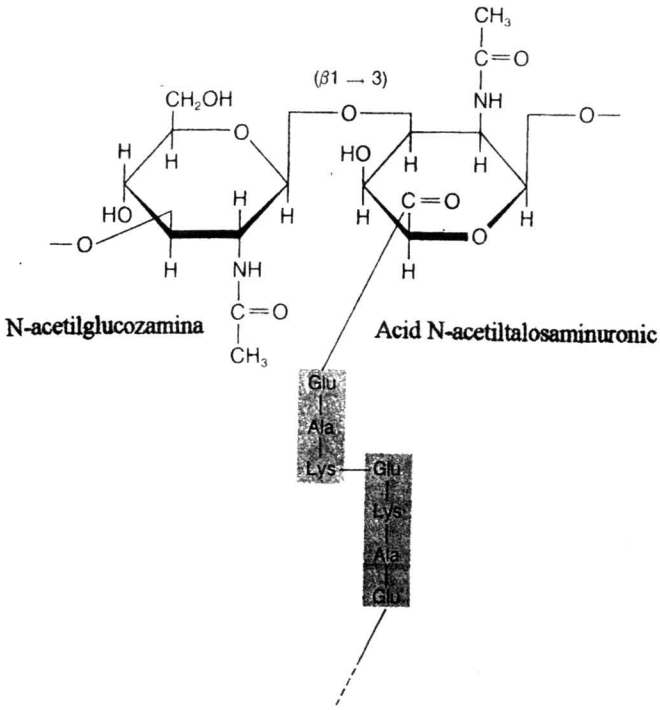


Fig. 12. Structura pseudomureinei, polimerul peretelui celular la *Methanobacterium* sp.

Din punct de vedere chimic, peretele la *Archaea* este heterogen. La *Methanobacterium (*producătoare de metan*)*, peretele conţine o *pseudomureină* alcătuită din unităţi repetitive formate din două zaharuri aminate (N-acetilglucozamină şi acidul N-*acetiltalosaminuronic*, markerul biochimic al domeniului *Archaea*), legate beta 1-3. Resturile acidului N –acetiltalosaminuronic sunt legate prin punţi peptidice (ca şi la mureină), iar aminoacizii sunt numai izomeri L. Legăturile beta 1-3 ale pseudomureinei sunt rezistente la acţiunea lizozimului.

Peretele celular acido- rezistent al micobacteriilor

Cel de al IV-lea tip de structură chimică a peretelui se găseşte la micobacterii. Unele genuri (*Mycobacterium tuberculosis, Corynebacterium diphteriae, Nocardia asteroides)* conţin lipide complexe, care nu se găsesc în structura parietală a altor bacterii. Ele se colorează slab după protocolul coloraţiei Gram, dar se colorează la cald cu fuxină bazică concentrată şi sunt rezistente la decolorare succesivă cu acid sulfuric diluat şi alcool etilic 96%. Aceste organisme se numesc *acido-alcoolo-rezistente.*

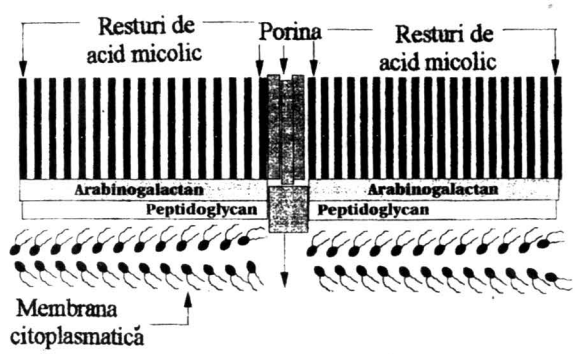


Fig. 13. Reprezentarea schematică a componentelor peretelui celular acido-rezistent, la grupul *Mycobacterium-Nocardia*. Regiunea externă a învelişului conţine unităţi lungi de acid micolic, legate de arabinogalactan (după Holt, 1998).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Rezistența la decolorare se datorează compoziției chimice a peretelui celular. Peptidoglicanul micobacteriilor conține acid diaminopimelic ca acid diaminic major, iar acidul muramic este N-glicozilat (și nu N-acetilat).

Un alt compus major parietal al micobacteriilor este polizaharidul cu greutate moleculară mare – *arabinogalactanul* – de care se leagă acizi grași cu catenă lungă – *acizii micolici* – cu 70–90 atomi de C. La *Corynebacterium* și *Nocardia*, acizii grași au catenă mai scurtă (40–60 de atomi de C).

A II-a categorie de lipide, cele "libere", sunt lipooligozaharide ce conțin trehaloza și lipoarabinomanani.

Funcțiile peretelui celular

Peretele celular este o structură cu rol esențial în arhitectura celulară, pentru că determină forma celulei și menținerea ei. După pierderea conținutului celular, sacul mureinic păstrează forma inițială a celulei.

Mureina conferă elasticitate și plasticitate celulei, permițând mărirea volumului ei prin creștere. Plasticitatea este capacitatea de a suferi deformări la presiune, fără alterarea structurii celulare.

Peretele celular participă la realizarea următoarelor funcții:

- constituie o barieră suplimentară de *permeabilitate*, alături de membrana citoplasmatică. La bacteriile Gram pozitive, peretele are o porozitate de 1,1 nm, permițând trecerea moleculelor mai mici de 1200 D[1]. La bacteriile Gram negative, membrana externă a peretelui conține proteine cu rol în procesele de permeabilitate, denumite *porine*, legate necovalent de mureină, care funcționează ca adevărate canale moleculare. La *E. coli*, porinele sunt proteine trimere, subunitățile delimitând un por cu diametrul de 1 nm .

Porinele reglează permeabilitatea membranei externe în funcție de condițiile mediului: în mediile cu osmolaritate mică (cele naturale), porinele sunt mai permeabile, iar la bacteriile patogene, în organismul gazdă, porinele au permeabilitate mai mică.

Membrana externă are rolul unei site moleculare și permite difuzia moleculelor mici, dar reține pe cele mari (enzime);

- la bacteriile Gram pozitive, peretele participă la formarea septului de diviziune, ce separă cele două celule surori;
- peretele participă la procesele de creștere. Creșterea volumului celular este rezultatul creșterii peretelui;
- membrana externă conține proteine cu funcții de transport molecular. Ele au rolul de receptori de vitamine, glucide, aminoacizi, de transferine (leagă Fe și îl transferă în celulă);
- în membrana externă se găsesc proteine de virulență ale bacteriilor patogene. Acestea sunt *adezine*, cu rol de fixare a bacteriei pe celulele sensibile;
- LPS are proprietăți *chimiotactic negative* față de fagocite, mărind nivelul virulenței bacteriene și conferă individualitate biochimică și serologică diferitelor tulpini;
- LPS este *antigenic* și induce sinteza anticorpilor specifici cu rol protector.

În concluzie, peretele celular este o structură esențială a celulei bacteriene, îndeplinind funcții multiple, dintre care protecția față de liza osmotică în mediile hipotonice este cea mai importantă. Singurele procariote care nu au o structură parietală sunt *micoplasmele*. Ele se pot izola din organismul uman, de la animale, plante, insecte, fungi, din sol, ape menajere. Toate sunt saprobionte, trăind pe materia organică în mediile naturale (ape menajere, sol) sau comensale la om și animale, pe mucoasele bucofaringiană și genitourinară, incapabile să se dezvolte în mediul extern ca saprobionte. Unele dintre cele comensale sunt potențial patogene. Faptul că supraviețuiesc, deși nu au perete celular se explică prin aceea că au o membrană citoplasmatică rigidă (care conține steroli) și pentru că trăiesc în medii protejate osmotic, așa cum este organismul animal și uman.

---

[1] Un dalton este egal cu masa atomului de H, adică 1,672649 x 10^{-24}g. 1 kD = 1 000 D.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Protoplaştii bacterieni

Protoplastul este structura organizată a componentelor celulare care rămâne după îndepărtarea peretelui celular şi care, păstrându-şi viabilitatea realizează procese metabolice, biosinteze şi transfer de energie.

Protoplaştii bacterieni au fost obţinuţi experimental în 1952 de către Salton. El a evidenţiat că peretele celular de *Micrococcus lysodeikticus* s-a digerat sub acţiunea lizozimului.

Cea mai folosită metodă de obţinere a protoplaştilor este digestia enzimatică cu lizozim, a peretelui bacteriilor Gram pozitive. Lizozimul, care se găseşte în lacrimi, salivă, albuş de ou, atacă mureina (peptidoglicanul) prin hidroliza legăturilor beta 1-4 ale lanţurilor polizaharidice. Rezultă un dizaharid format din N-acetilglucozamină şi N-acetilmuramic, la care rămân ataşate catenele peptidice.

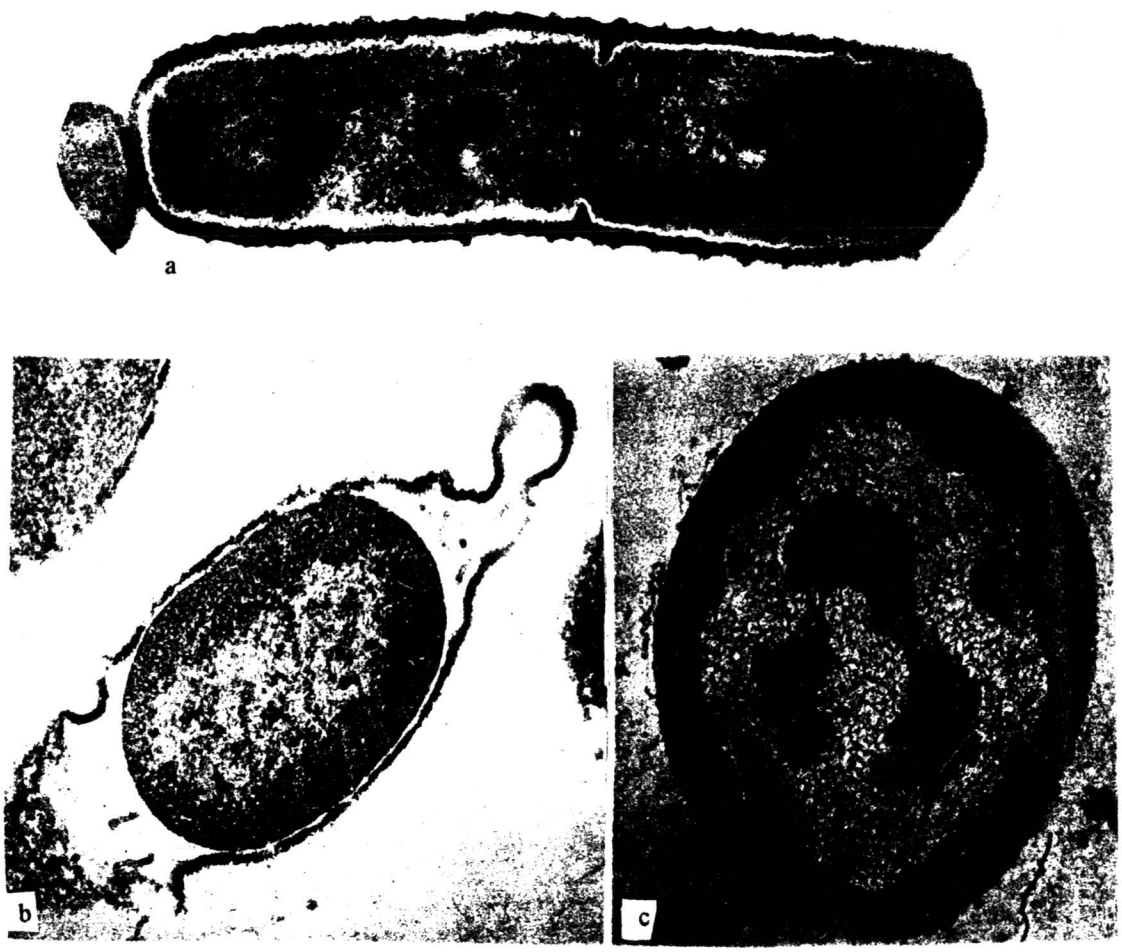


Fig. 14. a. Imaginea electrono-optică a unei celule de *Bacillus subtilis.* În regiunea centrală s-a iniţiat formarea septului de diviziune. b. Un stadiu intermediar al degradării peretelui sub acţiunea lizozimului şi retracţia protoplastului. c. Protoplastul.

Protoplastul este foarte sensibil la liza osmotică. Citoplasma celulei bacteriene este o soluţie mai concentrată (10 mM) decât a mediului de suspensie. Apa trece din compartimentul cu concentratrie mică, în cel cu concentraţie crescută, printr-un proces denumit *osmoză.* Într-un mediu neprotejat osmotic, apa pătrunde în protoplast şi se produce *plasmoliza.*

Intr-un mediu protejat osmotic, protoplaştii celulelor Gram pozitive îşi păstrează integritatea structurală, capacitatea respiratorie, de biosinteză, de creştere şi diviziune şi chiar de replicare a fagului, dacă infecţia s-a făcut înainte de îndepărtarea peretelui.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mediul de protecţie osmotică (de protoplastizare) trebuie să conţină o concentraţie mare a unor substanţe pentru care membrana celulară este impermeabilă (soluţie de sucroză 0,3 M). Dacă mediul de suspensie este hipertonic, protoplastul pierde apa şi colapsează, proces denumit *plasmoptiză*.

În condiţii speciale de mediu, protoplastul îşi regenerează peretele şi revine la forma originală a celulei, proces denumit *reversie*. Regenerarea este sigură dacă protoplastul mai păstrează un rest de perete, care va funcţiona ca primer al resintezei structurii parietale.

Tratamentul cu lizozim nu este eficient pentru conversia bacteriilor Gram negative la protoplaşti, datorită membranei externe care împiedică accesul enzimei la peptidoglican. Pentru creşterea eficienţei acţiunii enzimatice, celulele se tratează cu EDTA, care diminuă concentraţia ionilor de Mg. Se formează *sferoplaşti* (celule sferice înconjurate parţial sau total de membrana externă).

Spaţiul periplasmic

Spaţiul periplasmic este un compartiment celular al bacteriilor Gram negative, delimitat de membrana externă a peretelui celular şi de membrana internă (citoplasmatică). Este singurul compartiment al celulei procariote şi conţine un volum apos semnificativ în care se găsesc proteine şi oligozaharide. Proteinele sunt reprezentate de enzime *degradative* (DN-aza, RN-aza, proteaze, fosfataze, penicilinaza etc.) şi proteine de *legare* specifice pentru diferite molecule, cu rol în transport şi chimiotaxie.

Oligozaharidele se găsesc în concentraţii variabile şi au rolul de a regla presiunea osmotică a celulei. Când presiunea osmotică a mediului creşte, oligozaharidele trec în citoplasmă, iar când scade, oligozaharidele revin în spaţiul periplasmic.

Spaţiul periplasmic îndeplineşte o funcţie esenţială ce constă în acumularea nutrienţilor moleculari din mediu, înainte de a pătrunde în celulă. Spaţiul periplasmic funcţionează ca un compartiment adaptativ, a cărui funcţie de depozit este foarte importantă, deoarece bacteriile Gram negative trăiesc, de cele mai multe ori, în mediile oligotrofe (mediile aquatice).

În spaţiul periplasmic, nutrienţii sunt scindaţi parţial sub acţiunea enzimelor degradative şi de aici sunt preluaţi de proteinele de transport din membrana internă şi transferaţi în celulă.

Proteinele periplasmice pot fi eliberate prin conversia celulelor la protoplaşti, după tratamentul cu cloroform sau prin şoc osmotic (tratamentul celulelor cu EDTA în mediu hipertonic şi transferul lor în mediu hipotonic).

Membrana plasmatică

Membrana plasmatică înconjură celula bacteriană şi este bariera separatoare a citoplasmei de mediul extern. Consecinţa imediată a lezării membranei este pierderea componentelor citoplasmatice.

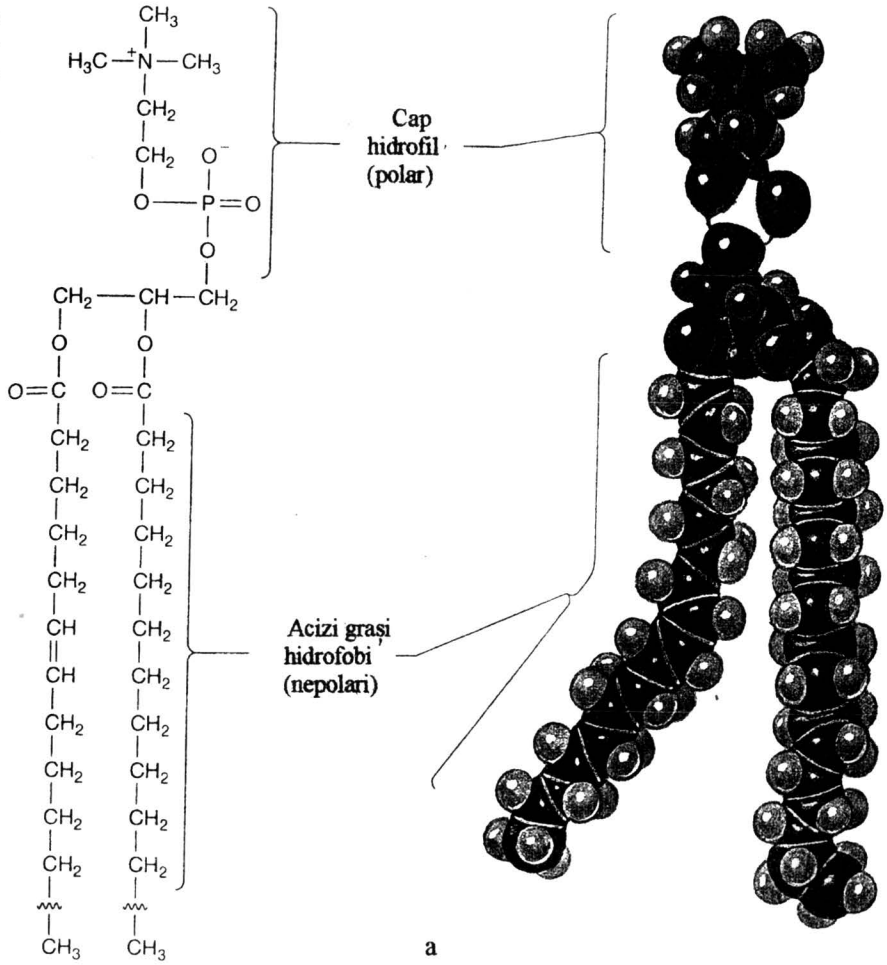
Grosimea membranei este de 7-10 nm. La microscopul electronic, are o structură trilaminară, după modelul unitar al membranelor celulare ("unit membrane") al lui Robertson. Pe baza structurii fine s-a considerat (eronat) ca membrana plasmatică este alcătuită din două straturi de proteine, între care se găseşte unul lipidic.

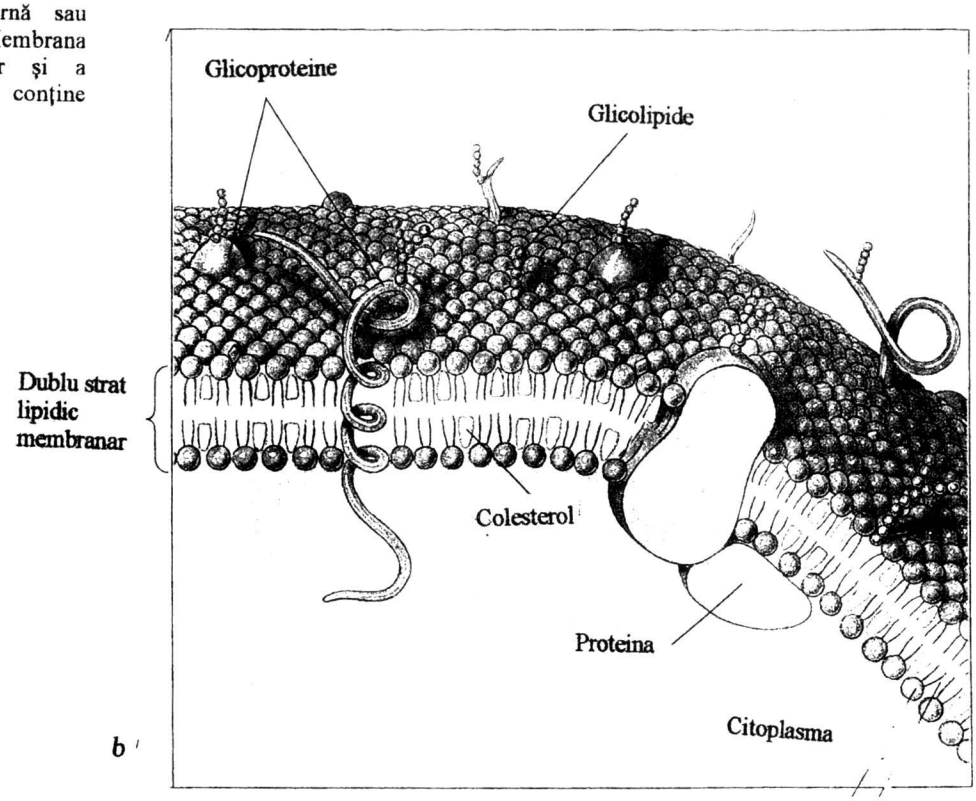
Membrana celulei procariote conţine proteine, glucide şi lipide, dar spre deosebire de membrana celulei eucariote nu conţine steroli.

Singer şi Nicolson au propus modelul *mozaicului fluid* de organizare a membranelor biologice, în acord cu care membranele sunt structuri bidimensionale de proteine globulare şi lipide, cu distribuţie orientată, stabilizate de cea de a III-a componentă majoră – apa. Moleculele de apă sunt legate prin punţi intermoleculare de H, formând o structură de reţea. Dizolvarea unei molecule în apă are semnificaţia stabilirii unei continuităţi între structurile chimice ale moleculei dizolvate şi structura de reţea a apei. Pentru a se integra în structura de reţea de apei, molecula trebuie să formeze o legătură de H cu apa sau să accepte o legătură a acesteia.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 15. a. Reprezentarea schematică a moleculei fosfolipidice, componenta structurală a membranei. Fosfolipidele sunt molecule polare. „Cozile" de acizi graşi sunt foarte hidrofobe (nu formează legături cu apa) şi constituie o barieră de permeabilitate faţă de moleculele hidrosolubile. „Capul" moleculei este format din gruparea fosfat, legată de o grupare care conţine N şi din glicerol. Este foarte hidrofil (formează legături cu moleculele de apă). b. Modelul mozaicului fluid al structurii membranei. Fosfolipidele formează un strat dublu, cu componentele hidrofobe orientate spre interior, iar capetele hidrofile constituie suprafaţa internă şi externă a membranei. În „marea" lipidică, proteinele plutesc ca nişte „icebergur". Unele se extind în toată grosimea dublului strat lipidic, iar altele sunt ancorate pe faţa internă sau externă. Membrana micoplasmelor şi a eucariotelor conţine colesterol.





https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Membrana este un dublu strat fosfolipidic şi glicolipidic, la care se asociază proteinele membranare. Ansamblul molecular al membranei este asemănat cu un ocean fosfolipidic, în care plutesc ca nişte iceberguri, proteinele *externe (periferice) şi integrate.*

Proteinele conferă membranelor, multe din proprietăţile funcţionale specifice (de exemplu, menţinerea şi utilizarea gradientului transmembranar de H pentru sinteza ATP).

În raport cu dispunerea lor în structura membranei, proteinele sunt *periferice* şi *integrate.*

Proteinele *periferice* sunt asociate cu membrana, dar nu au nici o secvenţă inclusă în structura ei. Clasa proteinelor periferice este împărţită în două subclase:

- *proteinele asociate membranei* sunt globulare, legate pe suprafaţa membranei, fie de stratul lipidic, fie de proteinele integrate;
- *proteinele membranare de schelet* formează scheletul membranei şi sunt localizate imediat sub membrana plasmatică a celulei. Ele se asociază componentelor membranei, iar în celula procariotă se leagă şi cu citoscheletul.

Clasa proteinelor membranare *integrate* are cel puţin un domeniu al moleculei situat în regiunea hidrofobă a stratului lipidic. Ele pot fi dislocate din structura membranei, numai în prezenţa detergenţilor ce solubilizează lipidele. Proteinele integrate difuzează liber în planul lateral al matricei lipidice, dar nu trec liber dintr-un strat în altul şi de aceea asimetria funcţională a membranei se păstrează pentru perioade lungi.

Clasa proteinelor integrate se împarte în două subclase:

- *proteinele transmembranare* au o mare parte a masei lor inclusă în dublul strat fosfolipidic, dar expun domenii semnificativ diferite pe ambele feţe ale membranei, ceea ce conferă asimetria funcţională a acesteia.
- *proteinele membranare ancorate* au un domeniu ce penetrează stratul lipidic, dar nu traversează complet membrana. Sunt ancorate de membrană prin legatură covalentă cu lipidele.

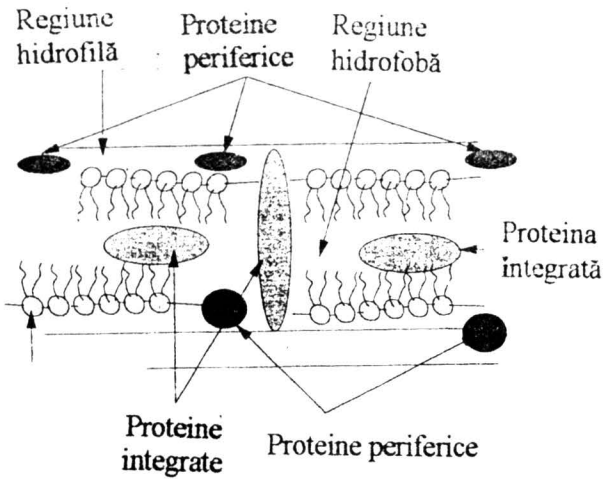


Fig. 16. Reprezentarea schematică a localizării proteinelor membranare. Proteinele periferice sunt în raporturi spaţiale strânse cu capetele hidrofile ale fosfolipidelor. Proteinele integrate sunt localizate în dublul strat fosfolipidic ori au domenii care se extind în regiunile hidrofile (după Holt şi colab. 1998).

Proteinele membranare periferice au o structură analogă proteinelor hidrosolubile. Cele integrate au o structură diferită, deoarece cel puţin un domeniu al moleculei este inclus în mediul hidrofob al lipidelor şi trebuie să fie compatibil cu acesta. Secvenţa de aminoacizi a domeniului inclus în stratul lipidic este hidrofobă, are cofiguraţia alfa-helix şi cuprinde 19-23 aminoacizi.

Domeniul extralipidic al proteinelor integrate este hidrofil, ceea ce conferă *asimetria structurală şi funcţională* a membranei: permeabilitatea feţei interne este superioară aceleia a feţei externe.

Asimetria structurală a proteinelor integrate se evidenţiază pe imagini eletrono-optice ale membranei criofracturate. Tehnica criofracturării presupune îngheţarea rapidă a membranei la temperatura azotului lichid şi fracturarea membranei cu un cuţit special. Membrana se clivează de-a lungul regiunii hidrofobe a acizilor graşi şi rezultă două jumătăţi de membrană, cu un grad accentuat de asimetrie, conferită de proteinele transmembranare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Structura membranei plasmatice este stabilizată prin legături de H şi interacţiuni moleculare hidrofobe. Ionii de Mg şi Ca realizează legături ionice cu sarcinile negative ale fosfolipidelor şi stabilizează structura membranei.

Lipidele conţin acizi graşi, predominant cu 14-16 atomi de C, saturaţi sau nesaturaţi.

În raport cu capacitatea lor de a interacţiona cu structura apei, lipidele membranelor biologice conţin două categorii de structuri chimice: restul de glicerol intră în structura de reţea a apei, fiind hidrofil, iar restul moleculei (acizii graşi) formează componenta hidrofobă a moleculei.

Într-o soluţie apoasă, lipidele se agregă şi formează spontan structuri în dublu strat: acizii graşi la interior, în mediul hidrofob, iar moleculele de glicerol rămân expuse în mediul apos.

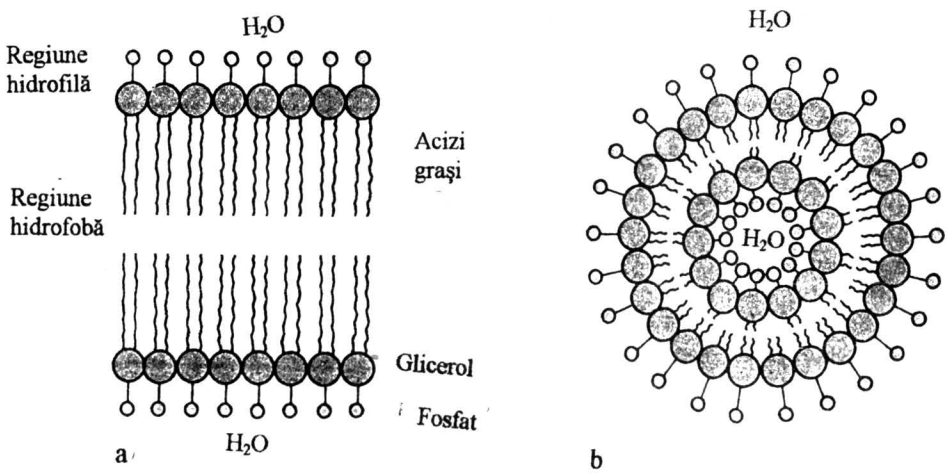


Fig. 17. Structura de bază a dublului strat fosfolipidic. a. Dublul strat fosfolipidic. b. Distribuţia stabilă a moleculelor lipidice în apă, cu formarea unei vezicule membranare (după Brock, 1988).

Funcţiile membranei s-au studiat folosind ca model, veziculele membranare artificiale sau naturale, ce se formează spontan după spargerea celulelor. S-a demonstrat astfel că procariotele îşi reglează fluiditatea membranei, prin modificarea proporţiei acizilor graşi saturaţi/nesaturaţi. Cultivarea la temperaturi scăzute măreşte proporţia acizilor graşi nesaturaţi şi sporeşte gradul de fluiditate a membranei. Prin răcire, faza de cristal lichid a lipidelor membranare trece spre o stare solidă de gel, situaţie în care grosimea dublului strat creşte datorită extensiei catenelor de C ale lipidelor.

Dublul strat lipidic este o structură ordonată. Catenele de carbon ale acizilor graşi sunt constrânse la o aşezare paralelă şi datorită caracterului hidrofob, nu se deplasează uşor în afara membranei. Moleculele fosfolipidice sunt foarte mobile şi se deplasează în plan lateral (bidimensional), în acelaşi strat, cu o frecvenţă foarte mare, dar miscările flip-flop, dintr-un strat în celălalt (tridimensionale) sunt foarte rare (una la câteva ore).

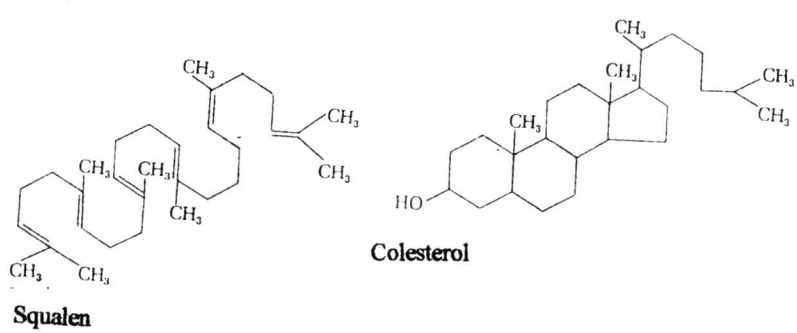


Fig. 18. Structura moleculară a squalenului (cu 30 de atomi de C), precursorul biosintetic al sterolilor şi structura colesterolului (un steorol tipic).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cu excepţia micoplasmelor, membrana procariotelor se deosebeşte de cea a eucariotelor prin absenţa sterolilor. Sterolii sunt molecule plane, rigide, iar acizii graşi sunt flexibili. Sterolii conferă un grad superior de rigiditate membranei plasmatice. Rigiditatea membranei eucariotelor ar fi necesară pentru a suporta forţele fizice care se exercită asupra ei.

Antibioticele polienice (nystatin, candicidin) reacţionează cu sterolii şi destabilizează membrana. De aceea ele sunt active faţă de celulele eucariote şi nu afectează celulele procariote.

Micoplasmele încorporează în structura membranei, sterolul disponibil în mediul de creştere şi sunt sensibile la antibioticele polienice. Stratul lipidic este suportul moleculelor proteice şi are rolul unei bariere de permeabilitate. Permeabilitatea diferenţiată a celor două feţe ale membranei se explică nu numai prin asimetria proteinelor, ci şi prin compoziţia chimică diferită a lipidelor în cele două straturi ale membranei.

Membrana archaebacteriilor

Membrana citoplasmatică a archaebacteriilor are o structură electrono-optică obişnuită, dar din punct de vedere chimic este unică prin natura lipidelor.

Lipidele eubacteriilor şi eucariotelor sunt esteri ai acizilor graşi cu glicerolul. Lipidele archaebacteriilor *nu conţin acizi graşi* şi sunt de două tipuri: *glicerol-dieteri* şi *diglicerol-tetraeteri*.

C_3 al glicerolului conţine fosfat, sulfat sau un rest glucidic.

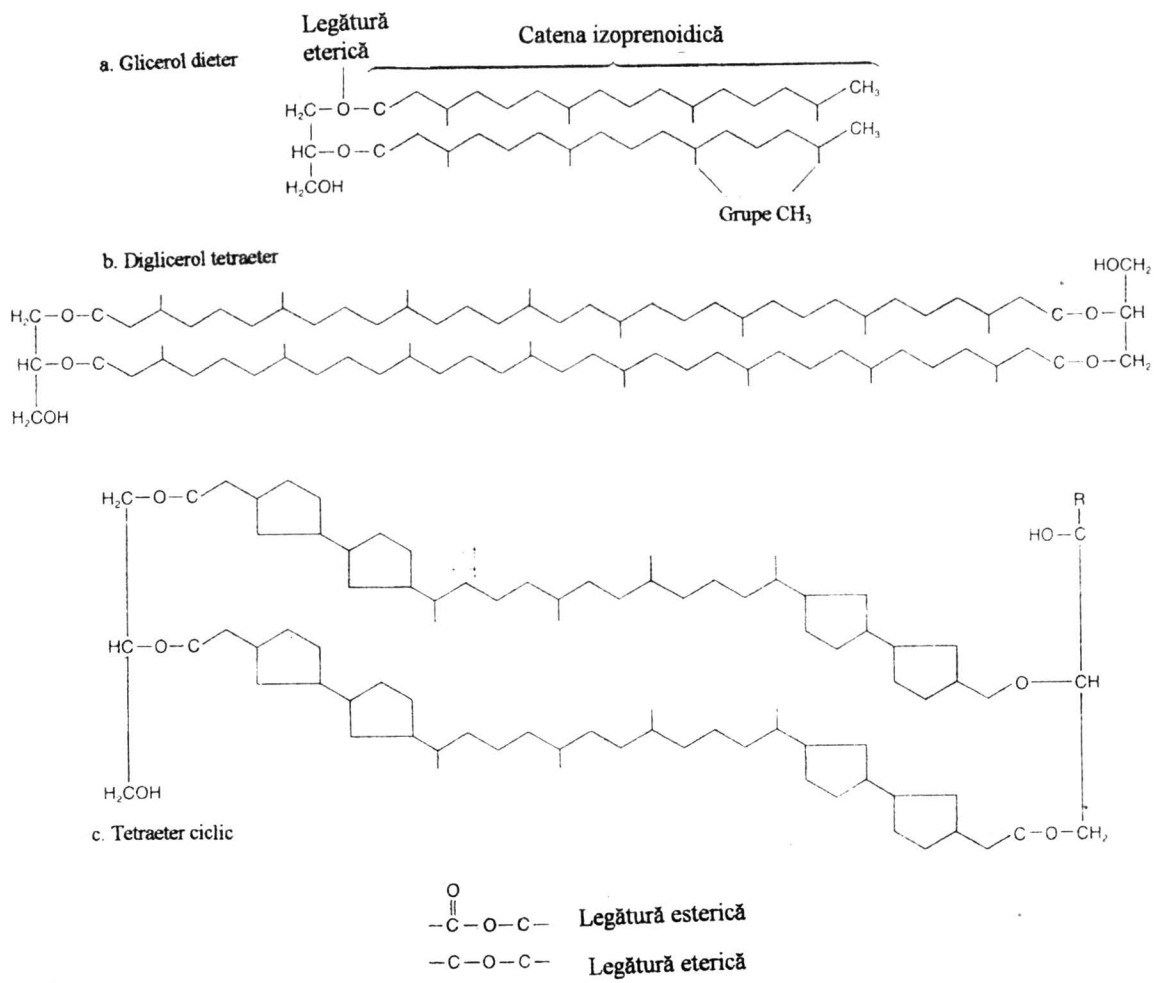


Fig. 19. Lipidele majore ale archebacteriilor. a. Glicerol dieterii. b. Diglicerol tetraeterii. c. Diglicerol tetraeteri pentaciclici. Catena de C este ataşată totdeauna de glicerol prin legături *eter*. d. Comparaţia legăturii *ester* din lipidele celorlalte organisme cu legătura *eter* a lipidelor archebacteriilor (după Brock, 1988).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Catenele izoprenoidice au între 15 şi 40 atomi de C. Membrana plasmatică a archaebacteriilor are două suprafeţe polare, cea internă şi cea externă, datorită resturilor de glicerol, iar interiorul este hidrofob, că şi la celelalte membrane. La archaebacterii, membrana nu conţine fosfolipide.

Glicerol-dieterii formează stratul dublu lipidic, prezent în structura membranelor celulare. La unele archaebacterii predomină net diglicerol-tetraeterii. La acestea, membrana este formată dintr-un *monostrat lipidic*. Diglicerol-tetraeterii sunt echivalentul chimic al dublului strat lipidic, dar diferenţa constă în faptul ca cele două straturi sunt legate covalent.

Glicerol-dieterii au catene laterale izoprenoidice de 20 atomi de C, iar diglicerol-tetraeterii au catene laterale de 40 atomi de C. La unele archaebacterii, catenele de C ale diglicerol-tetraeterilor sunt complicate prin existenţa a 4 inele pentaciclice, dar se păstrează lungimea de 40 de atomi de C.

Glicerol-eterii sunt markeri biochimici ai archaebacteriilor. Identificarea lor este utilizată pentru a identifica membrii grupului. Diferenţele biochimice dintre lipidele archaebacteriilor şi eubacteriilor evidenţiază distanţa evolutivă uriaşă între aceste linii filogenetice primare, deşi ambele sunt procariote.

Funcţiile membranei plasmatice

Membrana plasmatică este graniţa structurală şi de permeabilitate între mediul celular şi cel extern. Permeabilitatea foarte selectivă este asigurată de *asimetria sa funcţională*: este mai permeabilă pe faţa internă, ceea ce asigură menţinerea constanţei mediului intern faţă de cel extern, foarte variabil.

Membrana are rol de *barieră osmotică*, prin permeabilitatea foarte selectivă, permiţând trecerea (ieşirea) unor anioni, dar reţine cationii esenţiali care au acces în şi din celulă, numai pe calea unor unor sisteme specifice de transport.

Membrana permite trecerea unor molecule lineare şi a celor solubile în mediul lipidic al membranei (antibioticele cu moleculă polară) şi exclude moleculele mai mari decât glicerolul, dacă nu sunt transportate de sisteme membranare sau dacă nu se dizolvă în lipide.

Membrana este sediul *sinergonului respirator* (constituienţii moleculari care realizează procesele de respiraţie celulară şi formează sistemul de transport al electronilor). La *Azotobacter*, care are cea mai înaltă rată respiratorie, membrana îşi măreşte adaptativ suprafaţa formând numeroase intruzii veziculare.

Membrana este sediul *sinergonului fotosintetic*.

Este implicată în sinteza şi eliminarea *exoenzimelor*, iar la bacteriile patogene, în sinteza şi eliminarea unor substanţe toxice (exotoxine). Sinteza acestor molecule are loc la nivelul ribosomilor ataşaţi pe faţa internă a membranei plasmatice.

Membrana este sediul proteinelor cu rol de *chemoreceptori*, în special a celor ce dirijază mobilitatea orientată a celulei. Unele proteine membranare au rol de enzime ale sistemului ATP-azic. Altele asigură modelarea peretelui celular: sunt murein-hidrolaze şi murein-sintetaze.

La nivelul membranei se găsesc *proteinele de transport*, ce asigură transferul moleculelor din mediu în celulă şi invers, precum şi proteinele enzime ce realizează turnover-ul lipidelor şi proteinelor membranare.

Difuzia şi transportul moleculelor în celulă

Creşterea şi multiplicarea microorganismelor sunt condiţionate de disponibilitatea nutrienţilor care trebuie să străbată învelişurile celulare şi de eliminarea produselor de catabolism. În acelaşi timp, barierele celulare reţin în interiorul celulei, substanţele necesare, funcţionând ca adevărate "porţi moleculare", ce controlează intrarea şi ieşirea diferitelor molecule. Datorită structurilor de suprafaţă, celula bacteriană nu este niciodată în stare de echilibru cu mediul înconjurător, în privinţa concentraţiei diferitelor molecule, de o parte şi de alta a membranei citoplasmatice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În funcţie de mecanismele fizico-chimice care stau la baza lor, mecanismele de transport al moleculelor (electroliţi şi neelectroliţi) sunt:

- difuzia pasivă
- mecanismele de transfer cu moleculă purtător.

Difuzia pasivă

Difuzia pasivă este cea mai simplă modalitate de pătrundere a moleculelor în celulă. Ea caracterizează trecerea liberă a substanţelor prin membrana plasmatică în ambele sensuri şi se defineşte prin următoarele particularităţi:

- trecerea moleculelor se face fără consum de energie;
- forţa motrice a trecerii este gradientul de concentraţie, ceea ce înseamnă că transportul substanţelor se face din zona cu concentraţie mai mare, spre zona cu concentraţie mai mică a moleculelor;
- transferul durează până în momentul în care, moleculele substanţei care se transferă ajung la aceiaşi concentraţie pe ambele feţe ale membranei plasmatice;
- dacă de o parte a membranei se găsesc mai multe tipuri de substanţe, difuzia pasivă se face individual pentru fiecare tip de moleculă în parte, până la echilibrul osmotic al fiecărei categorii;
- difuzia pasivă se realizează lent şi nespecific. Factorul determinant al difuziei pasive este dimensiunea moleculei.

Prin difuzia pasivă trec moleculele de apă, O_2, CO_2 (molecule mai mici de 0,8 nm), precum şi moleculele liposolubile (care se dizolvă în lipidele membranei celulare, ca de exemplu, tetraciclina).

Membrana este permeabilă pentru apă şi pentru moleculele organice fără sarcină, până la dimensiunile glicerolului.

Fluxul molecular în oricare direcţie este proporţional cu concentraţia moleculei pe faţa de intrare, astfel încât rata netă de transfer este proporţională cu diferenţa de concentraţie între cele două compartimente, dar depinde şi de alţi factori: sarcina moleculei transportate, gradul ei de potrivire conformaţională cu discontinuităţile membranare ce formează calea de transport.

Moleculele mai mari decât glicerolul necesită *sisteme specifice de transport.*

Sisteme de transport cu molecule purtător

Moleculele purtător sunt componente ale membranei plasmatice, care au proprietatea de a lega substanţele dizolvate de o parte a membranei şi de a le transporta pe cealaltă parte, unde le eliberează.

Sistemele de transfer cu molecule purtător prezintă următoarele caracteristici:

- prin intermediul lor se realizează o trecere mai rapidă a moleculelor de pe o faţă pe cealaltă a membranei plasmatice;
- asigură trecerea *simultană* a mai multor tipuri de molecule, fără să existe fenomene de interferenţă;
- transferă în celule diferite molecule, chiar contra gradientului de concentraţie şi prin aceasta, permit acumularea moleculelor în celulă la concentraţii ce pot depăşi de 100–10000 de ori concentraţia lor în mediu (cu semnificaţie deosebită pentru bacteriile care trăiesc în apele oligotrofe, sărace în substanţe nutritive).

Se cunosc trei modalităţi de transport prin intermediul moleculelor purtător:

- difuzia facilitată
- translocaţia de grup
- transportul activ.

Difuzia facilitată

Difuzia facilitată se aseamănă ca mecanism, cu difuzia pasivă, deoarece forţa de propulsie a transportului este *diferenţa de concentraţie* a substanţei dizolvate, pe cele două feţe ale membranei plasmatice. Transferul moleculelor se face din zona cu concentraţie mai mare,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

spre zona cu concentraţie mai mică. Este un transport "la vale", ce nu implică consum de energie. În final, concentraţia substanţei în celulă este egală cu concentraţia sa în mediu. Nu se produce acumularea (concentrarea) moleculelor pentru că nu se consumă energie. Deosebirea faţă de difuzia pasivă, constă în aceea că intervin *molecule membranare care uşurează difuzia* moleculelor transportate. Ele sunt proteine integrate, cu domenii extramembranare, atât citoplasmatic cât şi la suprafaţa externă. Proteinele de membrană au rolul unor canale sau pori specifici pentru transferul diferitelor molecule. Pereţii canalului sunt relativ hidrofili şi favorizează trecerea moleculelor, spre deosebire de interiorul hidrofob al stratului lipidic.

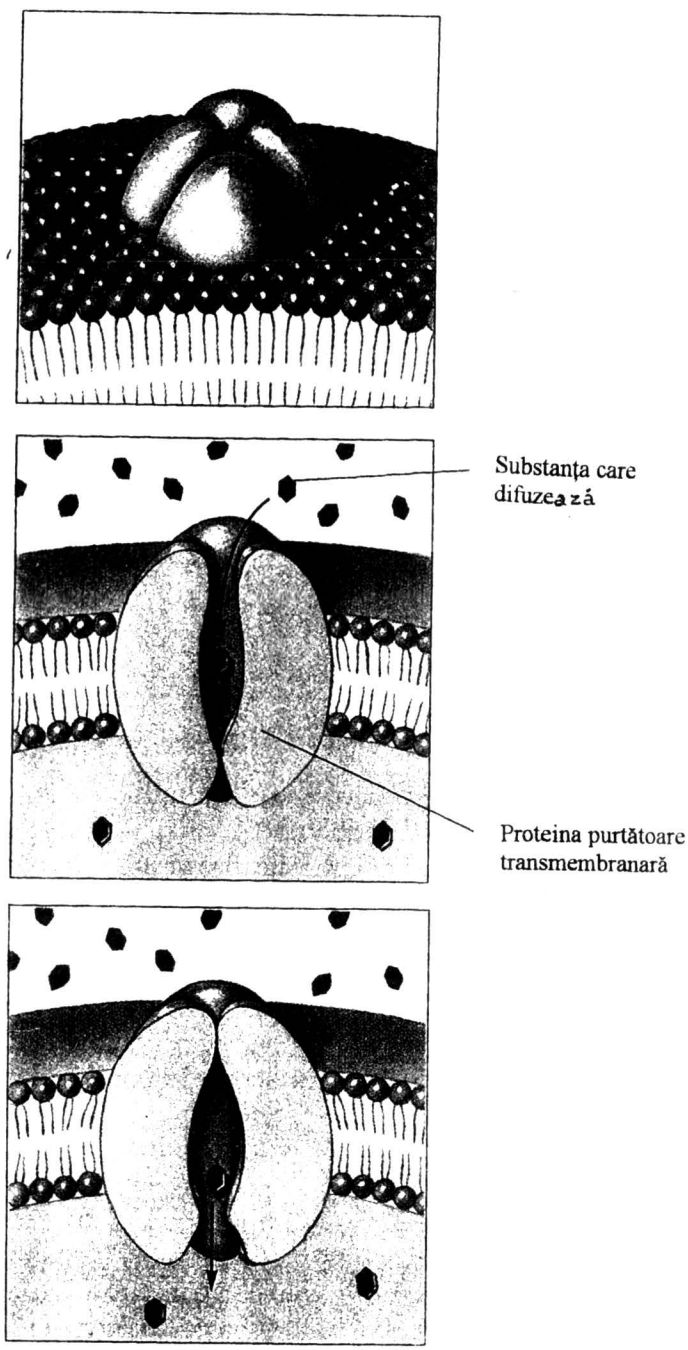


Fig. 20. Difuzia facilitată. Moleculele proteice purtătoare participă la transferul substanţelor prin membrana citoplasmatică, dar numai în sensul gradientului de concentraţie (de la concentraţie mare, la concentraţie mică). Procesul nu necesită cheltuială de energie (după Black, 1996).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Moleculele purtător îşi schimbă conformaţia spaţială, ceea ce le permite să se prezinte cu suprafaţa activă, alternativ, spre faţa externă sau spre faţa internă a membranei.

Mecanismul de transport al difuziei facilitate funcţionează în celulele adaptate la concentraţii mari de glucide în mediu (de exemplu, levuri, eritrocite). La bacterii, care trebuie să preia substanţele nutritive din soluţii diluate, nu s-au evidenţiat astfel de sisteme de transport.

Translocaţia de grup

Particularitatea fundamentală a acestei modalităţi de transport constă în faptul că, pentru a fi transportată prin membrana plasmatică, molecula este *modificată chimic*. Moleculele din mediu nu vor apărea în celulă în aceiaşi formă chimică, ci sub forma unui produs modificat. Astfel sunt transportate glucidele (glucoza, fructoza, manoza, lactoza, N-acetilglucozamina), bazele purinice şi pirimidinice, acizii graşi etc.

Moleculele sunt fosforilate prin *sistemul fosfotransferazei* cu un rest de acid fosforic. Sistemul enzimatic al fosfotransferazei este alcătuit dintr-o reţea de proteine citoplasmatice şi membranare, care se fosforilează în cascadă. Prima proteină a reţelei (HPr) are localizare citoplasmatică şi se fosforilează din fosfoenol-piruvat, rezultând HPr-P, cu eliberarea piruvatului. La nivelul membranei, ultima componentă a catenei de transport, o proteină integrată, fosforilează glucoza prin transferul grupării fosfat. Glucoza este transferată în celulă sub forma esterului glucozo-6-P.

La *E. coli*, sistemul fosfotransferazei este alcătuit din 24 de proteine, iar la transportul unui monozaharid participă cel puţin 4 componente.

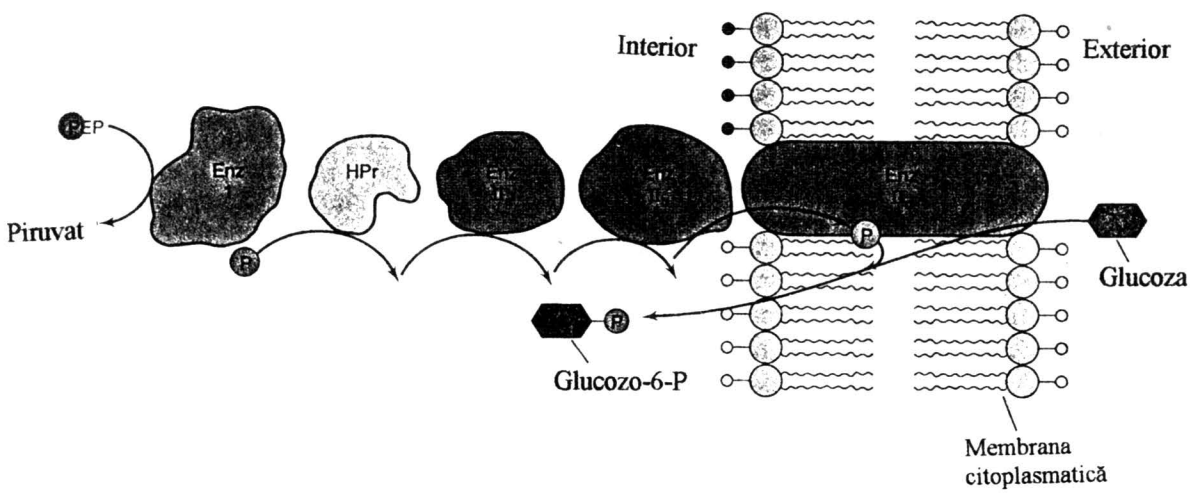


Fig. 21. Mecanismul de acţiune a sistemului fosfotransferazei la *E. coli*. Pentru transportul glucozei, sistemul constă din cinci proteine (Enz I, IIa, IIb, IIc şi HPr. Transferul secvenţial al grupării fosfat are loc de la fosfoenol-piruvat (PEP, prin intermediul proteinelor până la Enz IIc, care fosforilează şI transportă glucidul (după Brook, 1994).

Proteinele membranare fosforilate au rolul de *permeaze* şi formează unul din sistemele de transport prin membrana citoplasmatică.

Permeazele sunt proteine de transport foarte eficiente. Ele măresc viteza de transport de câteva ori în raport cu difuzia facilitată şi sunt factorii determinanţi ai ratei excepţionale a metabolismului bacterian. S-au identificat mutante bacteriene fără permeaze. Ele devin dependente de pătrunderea nutrienţilor prin difuzie şi necesită o concentraţie externă a moleculelor nutritive de 1000 de ori mai mare în raport cu tulpina parentală. Din categoria permeazelor fac parte:

- *sistemele de transport pentru glucide*, cu specificitate moderată, deoarece pot fi destinate transportului unei anumite molecule de zahăr sau unui grup de molecule glucidice. S-au identificat sisteme de transport pentru monozaharide, pentru dizaharide şi chiar pentru oligozaharide (de exemplu, sistemul de transport al maltozei poate transportă maltodextrine);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- *sistemele de transport pentru aminoacizi* au afinitate mai înaltă pentru substratul specific (comparativ cu cele ce transportă glucide), fapt care se corelează cu concentraţia diferită a celor două categorii de molecule în mediu şi cu rata lor diferită de metabolizare;
- *sistemele de transport pentru oligopeptide* au o specificitate mai mică de legare. La *E. coli* s-au identificat trei sisteme de transport ale oligopeptidelor: unul care leagă nespecific orice dipeptid, unul pentru tripeptide şi altul care leagă orice peptid mai mic de 6 resturi.

Relativa lipsă de specificitate a permeazelor face posibilă pătrunderea unor molecule pentru care membrana nu este permeabilă, prin cuplarea lor cu peptidele. Astfel pătrund agenţii chimici antibacterieni, care se leagă de peptide prin legături labile şi se eliberează intracelular, după hidroliza peptidelor.

Transportul membranar prin translocaţie de grup se realizează cu consum de energie. Este o modalitate de a economisi energia, deoarece energia cheltuită prin fosforilare este folosită atât pentru realizarea transportului, cât şi pentru prima treaptă a metabolizării glucidului.

Translocaţia de grup realizează acumularea moleculei transportate în celulă, la o concentraţie net superioară celei din mediu.

Transportul activ

Transportul activ este modalitatea de transfer intracelular al nutrienţilor contra gradientului de concentraţie, prin care substanţele pot fi concentrate de 1000 de ori în interiorul celulei, faţă de mediul extern. Se evidenţiază prin incubarea celulelor în prezenţa unui compus marcat radioactiv. Pentru a fi atribuită transportului activ, substanţa trebuie să se acumuleze în aceiaşi formă chimică (şi nu sub forma unui derivat al său).

Pentru aminoacizi, dovada se obţine mai uşor, deoarece încorporarea lor în proteine este anevoioasă, dar zaharurile sunt metabolizate rapid şi de aceea este necesar blocajul metabolic (prin mutaţie sau prin utilizarea unui analog nemetabolizabil).

Transportul activ se realizează cu consum de energie, prin intermediul *proteinelor membranare de transport*. Ele sunt proteine transmembranare şi au domenii expuse atât spre citoplasmă cât şi spre mediul extern.

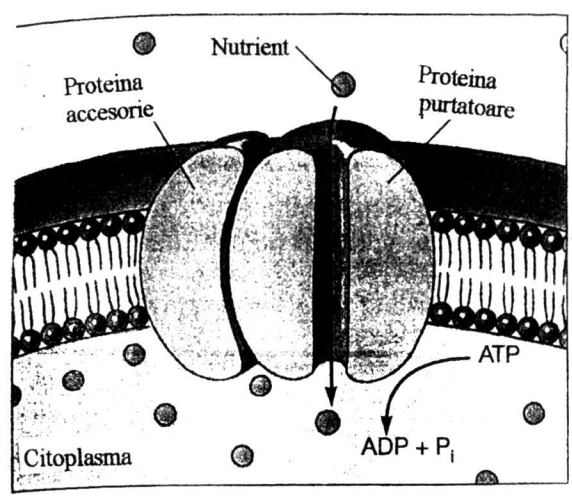


Fig. 22. Transportul activ. Ca şi în cazul difuziei facilitate, moleculele proteice purtătoare transportă moleculele prin membrană. Procesul are loc contra gradientului de concentraţie şi consumă energie din ATP (Pi = fosfat anorganic). Proteina accesorie condiţionează funcţia proteinei transportatoare (după Black, 1996).

Uneori transportul activ este foarte *specific*, adică pentru fiecare tip de moleculă transportată, există o anumită moleculă purtător, care o preia de pe o faţă a membranei şi o transferă pe cealaltă. Acestea sunt sisteme *uniport*. Alte sisteme transportă simultan, în acelaşi sens o substanţă, împreună cu o alta necesară pentru transport (sisteme *simport*). A III-a categorie realizează concomitent transportul a două tipuri de molecule, în direcţii opuse (sisteme *antiport)*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

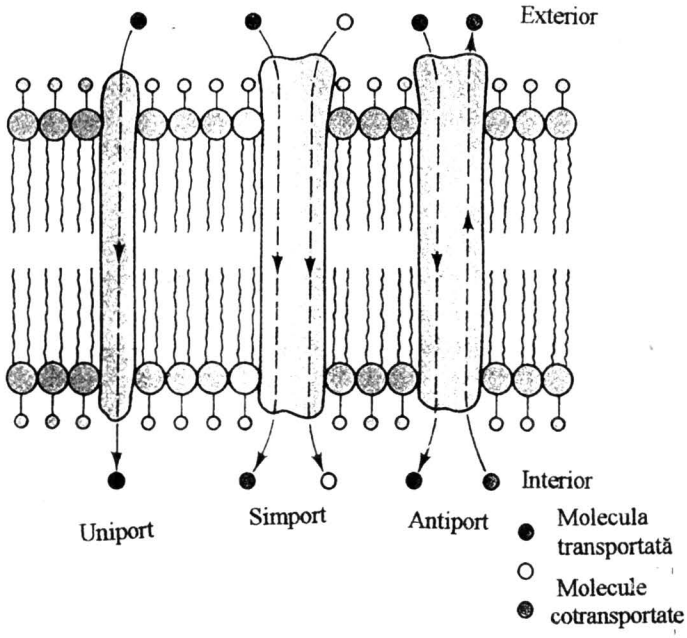


Fig. 23. Reprezentarea schematică a modului de acţiune a proteinelor de transport (după Brock, 1988).

Existenţa proteinelor purtător a fost dedusă din creşterea peak-ului electroforetic al proteinelor marcate în prezenţa moleculei transportate şi din dispariţia lor în celulele mutante pentru sistemul respectiv de transport. Prima proteină purtător, identificată printre proteinele membranare solubilizate este proteina *sistemului lac* la *E. coli*. Este o proteină inductibilă, iar în celulele bacteriene crescute în prezenţa lactozei, ea reprezintă 4% din totalul proteinelor membranare.

Substanţa care este transportată se leagă specific cu o proteină membranară purtător, după care molecula transportată este eliberată, nemodificată chimic, în interiorul celulei.

Substanţele transportate activ sunt unele glucide, aminoacizii, acizii organici, ionii anorganici (K^+, Mg^{2+}, sulfatul, fosfatul). Glucoza este luată prin procese active la unele bacterii şi prin sistemul fosfotransferazei, la altele.

Transportul activ necesită consum de energie, deoarece transportorii funcţionează pe principiul *pompelor concentrative*. La bacterii, energia necesară activării pompelor este rezultatul separării ionilor de H, de electroni, în grosimea membranei, ceea ce constituie forţa *proton-motrice*. Se creează un gradient de concentraţie a protonilor între exteriorul şi interiorul celulei. Protonii se concentrează la exteriorul celulei, iar în interior se concentrează OH^-. Potenţialul electrochimic are rol esenţial pentru transportul activ.

La bacteriile Gram negative, transportul moleculelor în celulă este rezultatul acţiunii a două mecanisme, ambele consumatoare de energie. Moleculele sunt transportate în spaţiul periplasmic prin intermediul *porinelor*, proteine de transport ale membranei externe. Ele permit intrarea ionilor şi a metaboliţilor cu moleculă mică hidrofobă. În spaţiul periplasmic, molecula transportată se combină specific cu o proteină periplasmică, care facilitează transportul în citoplasmă, pe calea unei proteine purtătoare specifice din membrana celulei.

Celălalt mecanism de transport este reprezentat de sistemul fosfotransferazei.

Adeseori, celulele bacteriene posedă două tipuri de sisteme de transport:

- *sisteme constitutive*, relativ nespecifice, în condiţiile unei relative abundenţe a nutrienţilor;
- *sisteme inductibile*, cu specificitate înaltă, active în condiţii de stress, provocat de deficitul substanţelor nutritive sau indus de substanţe toxice.

Sisteme celulare de transport ionic

Ionii nu difuzează liber prin membranele biologice. Ionii de K, Mg, sulfat, fosfat sunt transferaţi în celulă, prin intermediul unor sisteme membranare de transport cu specificitate înaltă, ce constau din proteine membranare integrate. Transferul fiecărei categorii de ioni este realizat de unul sau mai multe sisteme de transport.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sistemele de transport pentru ionii cu importanţă nutritrivă sunt *sisteme de influx*, iar cele pentru transportul ionilor toxici sunt *sisteme de eflux* şi reprezintă substratul molecular al mecanismelor de rezistenţă.

Sistemele de transport pentru Na^+, Ca^{2+}, H^+ şi Cl^- sunt sisteme de eflux şi au rolul de a menţine concentraţii intracelulare scăzute şi de a realiza gradiente ionice transmembranare. Sistemele de eflux pentru cationi consumă energie furnizată prin hidroliza ATP.

Unii ioni (Cu^{2+}, Zn^{2+}) au rolul de micronutrienţi, fiind utili la concentraţii mici şi sunt concentraţi prin sistemele de influx, dar sunt toxici la concentraţii mari, fiind eliminaţi prin sistemele de eflux. Pentru aceşti cationi, sistemele de influx şi de eflux sunt separate. Sistemele de eflux pentru cationii toxici sunt fie consumatoare de ATP ori sunt cuplate cu un sistem antiport de înglobare a altui cation (H^+, Na^+, Ca^{2+}).

Aparatul fotosintetic

Aparatul fotosintetic este o structură accesorie, prezentă numai la bacteriile fotosintetizante şi este reprezentată de complexul de structuri membranare şi particulate, care participă la procesul de conversie a energiei luminoase, în energie chimică. Spre deosebire de celulele eucariote, la care aparatul fotosintetic este localizat în structuri specializate, delimitate de membrană (cloroplastul), la bacterii aparatul fotosintetic este localizat la nivelul unor diverticuli ai membranei plasmatice, de formă tubulară, veziculară sau lamelară care, în general păstrează legătura fizică cu membrana plasmatică de origine. De aceea, membrana plasmatică este considerată ca sediu al *sinergonului fotosintetic*.

La bacteriile verzi (*Chlorobiaceae*) aparatul fotosintetic este format din vezicule care nu au legătură structurală cu membrana plasmatică. Fiecare veziculă este delimitată de o membrană monostrat. Conţinutul vezicular este omogen. Formarea veziculelor are semnificaţia unei modalităţi de compartimentare celulară a funcţiei fotosintetice, într-un organit specializat al celulei procariote (veziculele de *Chlorobium*).

La bacteriile purpurii (roşii) (*Chromatiaceae şi Rhodospirillaceae*), diverticulii membranari de formă veziculară sau lamelară, sedii ale pigmentului fotosintetic păstrează legătura cu membrana.

La cianobacterii, aparatul fotosintetic este constituit dintr-un sistem de saci membranari, structural independenţi de membrana plasmatică, aplatizaţi, denumiţi *corpi tilacoizi* (*tilacos*, grec = pungă). Aici se găsesc pigmenţii fotosintetizanţi şi sistemul transportor de electroni.

A II-a structură majoră cu rol în captarea luminii sunt *ficobilisomii*, aşezaţi în şiruri ordonate pe suprafaţa sacilor tilacoizi.

Mezosomul

Mezosomul (sau corpul din mijloc) este o structură derivată din membrană, a cărei poziţie în celulă este adesea mediană. Se mai numeşte *plasmalemasom* (corp derivat din membrana). Această structură a fost descrisă de câteva ori sub denumiri diferite (corpi periferici, condrioizi, membrane intracitoplasmatice).

Pentru ca o structură membranară să poată fi încadrată în categoria mezosomilor trebuie sa îndeplinească trei condiţii de bază:

- să derive din membrana citoplasmatică, adică să fie rezultatul unor invaginări ale membranei citoplasmatice, cu care structura mezosomală pastrează permanent legături de continuitate directă;
- să poată fi extruzată în spaţiul dintre membrana plasmatică şi peretele celular, prin creşterea presiunii osmotice a mediului de suspensie;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- să fie asociate cu următoarele procese importante ale celulei:
  a) cu replicarea cromosomului şi cu replicarea celor doi cromosomi în celulele surori;
  b) cu procesul de sporulare.

S-au descris trei tipuri morfologice de mezosomi: *tubulari, veziculari şi lamelari.* Unii autori consideră că aceste forme sunt reciproc reversibile, realizând un continuum structural.

Mezosomii sunt mai frecvenţi şi au o structură mai complexă, de tip lamelar, la bacteriile Gram pozitive. La cele Gram negative sunt mai rari şi au aspect tubular.

În mediile hipertonice, mezosomii se extruzează în spaţiul dintre membrana citoplasmatică şi peretele celular, ca o dovadă certă a legăturii lor structurale directe cu membrana plasmatică.

Structura moleculară a membranelor mezosomale este identică cu aceea a membranei plasmatice din care derivă: un strat dublu fosfolipidic, în care sunt inclavate proteinele structurale şi enzimatice.

Mezosomii sunt structuri foarte dinamice şi probabil, apar numai în anumite stări fiziologice ale celulei, când prezenţa lor este necesară. Formarea lor este o modalitate de extindere a membranei citoplasmatice spre interior care, datorită rigidităţii peretelui celular, nu se poate mări pe altă cale.

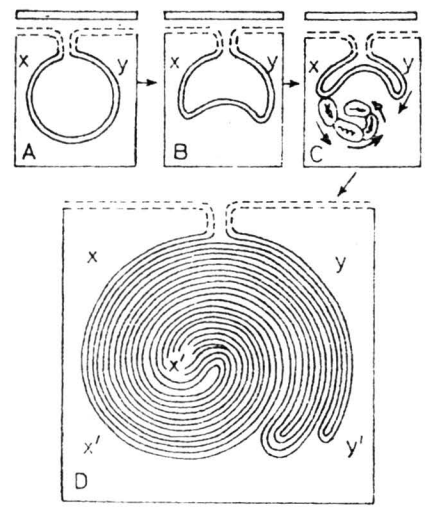


Fig. 24. Reprezentarea schematică a stadiilor de formare a mezosomilor. A, B. Dezvoltarea unui mezosom sacular turtit, dintr-un mezozom vezicular. X şi Y reprezintă situsurile potenţiale de creştere ale membranelor intracelulare. Pentru simplificare, diagrama ilustrează numai creşterea în punctul X. D. Mezosom cu structură complexă, multilamelară, format prin creşterea şi plierea sacului turtit.

Functiile mezosomului. Mezosomul este o structură multifuncţională:

- este asociat cu procesele de biosinteză şi de creştere celulară. Structurile mezosomale sunt foarte numeroase în celulele de *B. subtilis*, aflate în faza de creştere logaritmică;
- la nivelul mezosomului se găsesc situsuri de legare pentru cromosom şi pentru plasmide;
- este calea de transmitere a semnalului, originar la nivelul membranei, pentru replicarea cromosomului şi pentru diviziune, după ce dimensiunile celulei au atins o valoare critică;
- participă la procesul de segregare a celor doi cromosomi între celulele surori rezultate din diviziune;
- deoarece derivă din membrană şi împreună cu aceasta este sediul sinergonului respirator (adică la nivelul său se desfăşoară procese energetice celulare), mezosomul este considerat echivalentul structural şi funcţional al mitocondriei;
- este echivalentul funcţional al lizosomului, deoarece la nivelul său se găsesc enzime cu rol degradativ; este asociat cu funcţiile secretorii ale celulei. Mezosomii sunt mai numeroşi în celulele de *B. subtilis* producătoare de enzime. Participă într-un mod necunoscut la sinteza şi secreţia unor enzime inductibile (de exemplu, penicilinaza, pe care o secretă bacteriile rezistente la penicilină). În mediu fără penicilină nu se secretă penicilinază şi mezosomii lipsesc, dar apar în celulele care cresc pe mediul ce conţine penicilină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În ciuda funcţiilor multiple care li se atribuie, Nanninga (1985) contestă existenţa mezosomilor, considerându-i ca structuri artificiale (artefacte), induse ca rezultat al reacţiilor brutale, asociate cu tehnica de preparare a materialului examinat la microscopul electronic.

Citoplasma

Citoplasma celulei bacteriene este un sistem coloidal complex format din proteine, glucide, apă şi substanţe minerale. În citoplasmă coexistă stările de *coacervare, de emulsie şi de soluţie*, într-o continuă modificare a raportului lor cantitativ, care în ansamblu, datorită lipsei curenţilor citoplasmatici conferă caracterul unui *gel fluid*. .

Caracterul de gel este consecinţa *stării apei*. În celulă, apa se găseşte în două stări:

- *apa liberă* este cea care se deplasează liber în celulă şi care, la creşterea presiunii osmotice a mediului extracelular trece în afara celulei;
- *apa legată* în structura gelului citoplasmatic.

În celula bacteriană vegetativă, apa liberă (în proporţie de circa 70% din totalul apei) creează un mediu de suspensie pentru macromolecule.

Apa liberă este foarte *mobilă*, iar cea din structura gelului este practic imobilă. Starea de gel a citoplasmei păstrează componentele celulare separate spaţial.

Absenţa curenţilor citoplasmatici are ca rezultat imobilitatea conţinutului celular.

La celulele bacteriene tinere, aflate în faza logaritmică de creştere, citoplasma este fin granulară, intens bazofilă, datorită conţinutului ridicat de acizi nucleici, este densă şi omogenă.

ARN citoplasmatic este reprezentat de ARNr (80%), ARNt (10-20%) şi ARNm (2%).

În citoplasma celulelor tinere, proteina dominantă cantitativ este EFTu (*E*longation *F*actor *T*ermo-*u*nstable), care reprezintă circa 5% din totalul proteinelor. Acest factor participă la formarea legăturilor dipeptidice, la nivelul ribosomilor. Fiecare complex molecular ARNt-aminoacid ce aşteaptă recunoaşterea codonului este asociat cu EFTu. Abundenţa EFTu este reflectarea directă a ratei înalte a sintezei proteice.

În citoplasma celulelor îmbătrânite apar materiale de incluzie şi vacuole. Aspectul devine granular neomogen, iar bazofilia diminuă, datorită scăderii până la 0 a ratei sintezei ARN, precum şi datorită reducerii treptate a cantităţii existente. Afinitatea pentru coloranţii bazici este neuniformă.

Echilibrul osmotic al celulei bacteriene

În mediile naturale, bacteriile sunt supuse unor variaţii dramatice ale presiunii osmotice a mediului extern. De exemplu, bacteriile din sol supravieţuiesc perioadelor de uscăciune şi umiditate, bacteriile infecţioase ale tractului urinar supravieţuiesc variaţiilor de concentraţie a urinii, iar microorganismele industriale tolerează soluţii nutritive concentrate, precum şi acumularea extracelulară a produselor de metabolism.

La schimbarea osmolarităţii mediului lor, bacteriile răspund prin *mecanisme pasive sau active*. Răspunsul este prompt, deoarece membrana citoplasmatică este foarte permeabilă pentru apă.

La creşterea presiunii osmotice a mediului extern, bacteriile răspund în trei faze care se suprapun parţial:

- deshidratarea (pierderea unei părţi a apei celulei);
- ajustarea compoziţiei solventului citoplasmatic şi rehidratarea;
- remodelarea celulară (a peretelui, a nucleoidului, reluarea sintezei macromoleculelor, a creşterii şi a diviziunii celulare).

Răspunsul la scăderea presiunii osmotice parcurge deasemenea trei faze:

- înglobarea apei
- eliminarea apei şi a cosolvenţilor
- reacumularea cosolventului citoplasmatic şi remodelarea celulară.

Cosolvenţii sunt molecule dizolvate, care influenţează semnificativ proprietăţile de solvent ale apei. Cosolvenţii organici cu sarcină pozitivă (ectoina, glicin-betaina) sunt preferaţi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cationului K^+. Cosolvenţii se găsesc în interiorul celulei şi la exteriorul ei: NaCl şi glucidele predomină în mediul extracelular, iar K^+ şi cationii organici, care constituie solvenţii compatibili, sunt intracelulari.

Modificările presiunii osmotice a mediului extern sunt înregistrate de *osmosenzori*. Osmosenzorii pot fi localizaţi în membrana citoplasmatică şi în nucleoidul bacterian. Osmosenzorul este un ansamblu care detectează schimbările în activitatea apei extracelulare (osmosenzor direct) sau schimbările care rezultă în structura celulei(osmosenzor indirect). Spre deosebire de chemosenzor, care se bazează pe interacţiunea stereospecifică dintre ligand şi receptor, osmosenzorii sunt macromolecule care suferă modificări ale conformaţiei şi/sau oligomerizare, ca răspuns la schimbările solventului.

Echilibrul osmotic la bacteriile halofile

Microorganismele trăiesc în medii cu întregul spectru al concentraţiei de sare, de la apa dulce şi mediul marin, până la mediile în care NaCl are o concentraţie la saturaţie.

Microorganismele halofile şi halotolerante aparţin tuturor celor trei domenii: *Archaea, Bacteria* şi *Eucarya*.

Deoarece membranele biologice sunt permeabile pentru apă, celulele nu pot menţine o activitate a apei citoplasmatice mai mare decât a mediului salin înconjurător, deoarece apa trece rapid în mediu.

Microorganismele care trăiesc în medii cu salinitate foarte mare, păstrează un echilibru izoosmotic cu mediul extracelular. Menţinerea presiunii de turgor[1] necesită o presiune hiperosmotică. Cu excepţia halofilelor *Archaea* din ordinul *Halobacteriales*, toate organismele halofile îşi păstrează presiunea de turgor.

Microorganismele evită stressul osmotic determinat de concentraţiile saline înalte, prin două mecanisme:

- celulele pot să păstreze concentraţii saline intracelulare înalte (strategia salt-in), cel puţin echivalente din punct de vedere osmotic cu concentraţiile externe. Toate sistemele intracelulare vor fi adaptate prezenţei concentraţiei saline mari;
- celulele pot să-şi menţină concentraţii saline scăzute în citoplasmă, dar presiunea osmotică înaltă a mediului extern este echilibrată de soluţii compatibile organice (strategia soluţiilor compatibile). Macromoleculele celulei nu necesită mecanisme adaptative.

Strategia "salt-in" este utilizată de două grupuri neînrudite filogenetic: halofilele extreme din *Archaea* (ordinul *Halobacteriales*) şi halofilele anaerobe (ordinul *Haloanaerobiales*). Cu o excepţie, ele nu conţin soluţii osmotice organice, iar concentraţia ionică intracelulară este similară celei din mediul extern. În mediul extern se găseşte NaCl, iar în celulă se găsesc concentraţii echimolare de KCl.

La aceste celule, toate enzimele şi componentele structurale sunt adaptate la prezenţa concentraţiei saline mari. Enzimele lor sunt tolerante la condiţiile de salinitate. Proteinele lor au aminoacizi acizi în mare exces şi cantităţi mici de aminoacizi hidrofobi.

Cele mai multe proteine ale *Archaea* halofile depind de prezenţa concentraţiilor mari de sare pentru menţinerea conformaţiei adecvate activităţii. Sursa de energie pentru eliminarea Na^+ şi acumularea KCl este gradientul electrochimic de protoni prin membrana citoplasmatică, rezultat în procesul respirator.

La majoritatea organismelor halofile şi halotolerante, echilibrul osmotic este asigurat de molecule osmotice mici, fie sintetizate de celule, fie preluate din mediu când acestea sunt disponibile. Strategia soluţiei compatibile nu necesită prezenţa proteinelor adaptate la mediul salin. Soluţiile compatibile sunt acelea care, la concentraţii înalte, permit enzimelor să funcţioneze eficient.

[1] Presiunea de turgor este diferenţa de presiune hidrostatică care echilibrează diferenţa de presiune osmotică (osmolalitate) dintre interiorul şi exteriorul celulei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

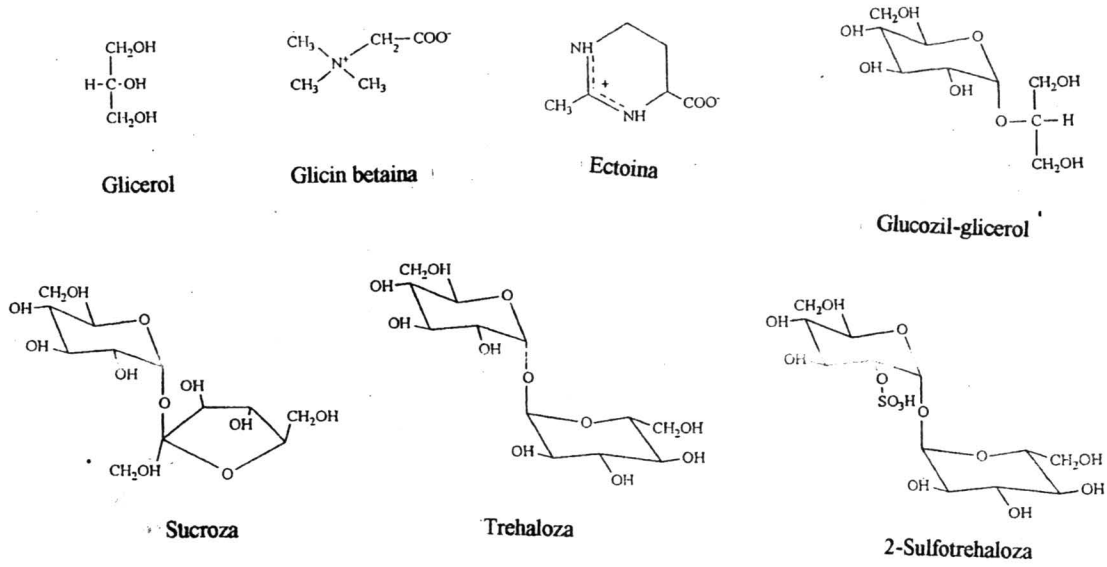


Fig. 25. Compuşi organici compatibili, la microorganismele halofile şi halotolerante.

Soluţiile compatibile detectate la microorganismele halofile şi halotolerante includ poliolii (glicerol, arabitol), derivaţi ai glucidelor (sucroza, trehaloza, glucozil-glicerol), aminoacizi şi derivaţii lor, amine quaternare (glicin-betaina).

Soluţiile compatibile sunt compuşi organici cu moleculă mică, solubile la concentraţie mare în apă şi sunt ori lipsite de sarcină, ori sunt pozitive la pH fiziologic. Substanţele organice compatibile interacţionează cu proteinele celulei într-un mod necunoscut.

Multe bacterii care acumulează ori sintetizează substanţe organice pentru stabilizarea osmotică, conţin şi concentraţii mari de Na^+ şi K^+.

Procesele vitale în medii saline şi hipersaline sunt costisitoare din punct de vedere energetic. Dintre toate soluţiile organice compatibile, glicerolul este molecula cea mai simplă şi cea mai ieftină pentru celulă. Este miscibil cu apa în orice proporţie. La *Bacteria* şi *Archaea*, acumularea glicerolului nu este posibilă, datorită absenţei sterolilor membranari. Pentru echilibrul osmotic, ele sintetizează alte molecule mai costisitoare din punct de vedere energetic.

Soluţiile care se sintetizează cu cea mai mică cheltuială de energie se găsesc la organismele care trăiesc la concentraţiile saline cele mai mari şi care necesită cea mai mare concentraţie de soluţie compatibilă.

Pentru sinteza unei molecule organice compatibile sunt necesare 23-79 molecule de ATP la heterotrofe, produse în timpul respiraţiei şi 30-109 molecule de ATP pentru biosinteză la autotrofe. Dar moleculele compatibile pentru soluţia osmotică pot să reprezinte şi o sursă de carbon şi energie, utilizabilă în condiţiile epuizării resurselor energetice externe. Când celulele trec în mediu cu salinitate scăzută (de exemplu, în lacurile sărate, când apa de ploaie se amestecă cu apa sărată), o parte a moleculelor organice cu rol osmotic devin disponibile. Unele molecule (glicin-betaina şi ectoina) nu sunt metabolizate, ci sunt excretate după trecerea celulei în mediul cu presiune osmotică mai mică. În mediul hipoosmotic, la *Dunaliella* (algă verde unicelulară), glicerolul este convertit în amidon (osmotic inactiv).

Multe microorganisme halofile şi halotolerante menţin un amestec de molecule osmotice compatibile şi reglarea sintezei lor este condiţionată de nevoile celulei.

Bacteriile care sintetizează molecule organice compatibile posedă proteine membranare de transport, care le permit să le incorporeze din mediu, dacă sunt disponibile.

Ribosomii

Ribosomii sunt particule ribonucleoproteice, localizate în citoplasmă, care la microscopul electronic au formă sferică, cu diametrul de 20 nm.

Pe baza constantei de sedimentare se disting următoarele categorii de ribosomi: a) *ribosomi 80 S**, în citoplasma celulelor eucariote; b) *ribosomi mitocondriali* şi *cloroplastici,*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

între 55 S la mamifere şi 75 S la plantele superioare; c) *ribosomii archaebacteriilor*, de 70 S, asemănători din punct de vedere funcţional cu ribosomii 80 S ai eucariotelor, datorită absenţei sensibilităţii la streptomicină şi cloramfenicol şi prin sensiblitatea la toxina difterică; d) *ribosomii eubacteriilor*, de 70 S.

Numărul ribosomilor în celula bacteriană, este corelat cu activitatea ei fiziologică: este mic în celulele în repaus, dar creşte foarte mult în celulele fiziologic active (în medie 20 000 ribosomi/celulă, cu variaţii între 15-100 000). Ribosomii sunt structuri dinamice, calitate ce se reflectă în capacitatea lor de a se disocia în două subunităţi, de 30 S şi 50S şi de a se reasocia. Disocierea şi reasocierea sunt corelate cu variaţia concentraţiei ionilor de Mg^{2+}: creşterea concentraţiei ionilor favorizează asocierea, iar scăderea concentraţiei lor, produce disocierea.

Constanta de sedimentare nu rezultă prin însumarea simplă a greutăţilor moleculare a subunităţilor componente, ci este condiţionată de factori fizici: o moleculă de formă aerodinamică sedimentează mai repede decât una sferică.

Circa 10% din numărul total de ribosomi sunt asamblaţi, liberi în citoplasmă. La nivelul lor se face sinteza *proteinelor structurale.* Alţi 10% se găsesc sub forma subunităţilor disociate, iar restul de 80% sunt *polisomi.*

Ribosomii au două localizări: liberi în citoplasmă sau ataşaţi feţei interne a membranei citoplasmatice. La nivelul celor ataşati se face sinteza proteinelor de export.

Studiul ribosomilor a beneficiat de tehnici din domeniul fizicii (metoda dispersiei neutronilor), care, în asociaţie cu tehnicile de chimie au permis înţelegerea structurii şi funcţiei ribosomilor.

Din punct de vedere chimic, ribosomii bacterieni conţin 55 de tipuri de molecule proteice şi trei tipuri de molecule de ARNr.

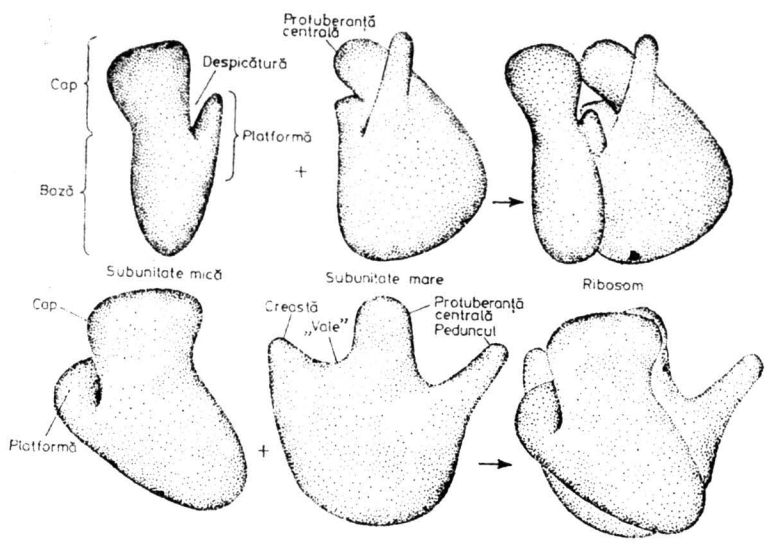


Fig. 26 A. Reprezentarea schematică a subunităţilor robosomale 30S şi 70S.

---

* Simbolul S semnifică viteza de sedimentare a unei particule sau a unei molecule prin tehnica ultracentrifugării. Viteza cu care o moleculă se deplasează într-un câmp gravitaţional este dependentă de două proprietăţi ale moleculei:

- greutatea moleculară (M): cu cât greutatea moleculară creste, cu atât creşte şi viteza de sedimentare;
- aspectul moleculei (o moleculă aerodinamică se deplasează mai repede decât una sferică). O moleculă mai compactă întâmpină o forţă de frecare mai mică şi se deplasează mai repede.

Raportul dintre viteza de deplasare a moleculei şi forţa centrifugă aplicată se numeşte *coeficient de sedimentare(S)*

S = Viteza/Forţa centrifugă

Valoarea lui S pentru o moleculă dată este aceiaşi în diferite soluţii.

Pentru majoritatea macromoleculelor, valoarea lui S este cuprinsă între 1 x 10^{-13} secunde şi loo x 10^{-13} secunde. în onoarea lui Svedberg, cel care a inventat centrifuga, *10^{-13} secunde este echivalentul unui svedberg sau S.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Subunitatea mică 30 S cuprinde 21 tipuri de molecule proteice (S_1-S_{21}), în ordinea descreşterii mărimii, cu greutăţi moleculare între 10 700 şi 65 000 D şi o moleculă de ARNr 16S, alcătuită din circa 16 000 nucleotide.

Subunitatea mare, 50S conţine 34 tipuri de molecule proteice (L_1-L_{34}, L= *L*arge), cu greutatea moleculară cuprinsă între 9-28,5 kD şi două molecule de ARNr, de 23S şi respectiv 5S. Cele două tipuri de molecule de ARN nu sunt transcrise separat, ci provin din scindarea unui precursor de 30S.

Cele 55 de tipuri de proteine ribosomale se găsesc într-un singur exemplar (o singură moleculă din fiecare tip). Unele au rol *structural*, fiind esenţiale pentru asamblarea ribosomului, altele au rol *funcţional*, permiţând legarea ARNm în procesul traducerii şi sintezei lanţului proteic. La *E. coli*, în fiecare subunitate ribosomală, raportul ARN-proteine este 2/1, iar la alte bacterii, raportul este 2/3.

La microscopul electronic s-a demonstrat că ribosomii au formă complexă, cea sferică percepută în mod obişnuit fiind rezultatul examinării cu sisteme optice cu putere redusă de rezoluţie. Subunitatea 50S are o formă asemănătoare cu aceea a unui fotoliu, iar subunitatea 30S se aseamănă cu o halteră asimetrică, rezemată orizontal pe braţele şi spătarul fotoliului. Intre cele două subunităţi rămâne un spaţiu prin care trece ARNm.

Moleculele componente au o distribuţie fixă, riguroasă în structura ribosomului. Interacţiunile lor fixe condiţionează procesele de autoasamblare a ribosomilor. Experimental, componentele ribosomale se dispersează şi se autoasamblează după restabilirea condiţiilor de mediu.

Ribosomii reprezintă componenta esenţială a sistemului de traducere a informaţiei genetice. Ei sunt adevaratele "fabrici" de proteine ale celulei. Ribosomii au rolul de a menţine atât molecula de ARNm, cât şi complexul aminoacil-ARNt, într-o orientare corespunzătoare pentru a permite atât citirea mesajului, cât şi formarea legăturilor peptidice.

Ribosomii se asociază în polisomi (poliribosomi), adică grupări funcţionale formate din 4-50 unităţi ribosomale. Dimensiunile polisomilor variază în funcţie de lungimea ARNm. Polisomii sintetizează concomitent mai multe molecule proteice pe aceiaşi moleculă de ARNm.

Rolul ribosomilor în sinteza proteică

În faza de creştere logaritmică a culturii bacteriene, la temperatura optimă (37°), cromosomul este transcris cu o rată de 60 nucleotide/secundă. În orice moment, în celulă se găsesc 400-800 molecule identice de ARNm, circa 100 molecule diferite de ARNt şi circa 700 molecule precursoare ale ARNr. Transcrierea fiecărei molecule de ARN este catalizată de o moleculă de ARN-polimerază. Cele circa 1600 molecule de ARN-polimerază reprezintă 1% din cantitatea de proteine celulare. La procariote, ARN este transcris de un singur tip de ARN-polimerază.

În celula procariotă, ribosomii au relaţii spaţiale strânse cu ADN, deoarece transcrierea şi traducerea informaţiei sunt două procese intim coordonate, care se desfăşoară aproape concomitent.

ARNm bacterian are o durată funcţională scurtă (1-2 minute). Pentru a surmonta acest handicap, înainte de terminarea transcrierii, la capătul 5' al moleculei de ARNm se ataşează un complex de iniţiere de 70S, care începe traducerea mesajului, înainte de transcrierea capătului 3'. Ulterior, se ataşează succesiv alţi ribosomi, rezultând structuri polisomice. Fiecare ribosom este legat de o moleculă proteică nascentă, a cărei lungime este direct proporţională cu lungimea mesajului pe care ribosomul l-a citit. După ce a citit integral informaţia ARNm, ribosomul părăseşte polisomul, eliberând în acelaşi timp, polipeptidul sintetizat.

Cuplarea transcrierii cu traducerea accelerează rata sintezei proteice, în sensul că traducerea nu trebuie să aştepte eliberarea ARNm de pe matriţa de ADN. La procariote, traducerea începe înainte ca ARNm să fie degradat de nucleaze.

În celula eucariotă, contactul ribosomilor cu ADN cromosomal nu este posibil, deoarece transcrierea şi traducerea informaţiei genetice sunt evenimente separate în timp şi spaţiu.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

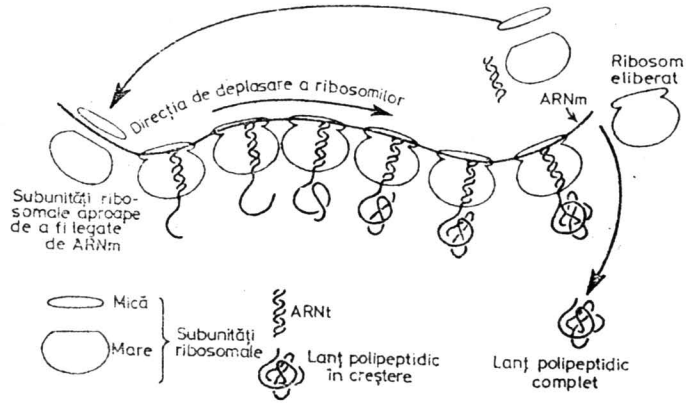


Fig. 26. B. Rolul ribosomilor în biosinteza proteinelor.

Polisomul este, o perioadă scurtă de timp, ataşat fizic de cromosomul bacterian, dar din cauze de ordin spaţial, legătura trebuie să se desfacă, deoarece lo-15 ribosomi depăşesc diametrul celulei. Mecanismul fizic al desprinderii polisomului de matriţa de ADN nu este cunoscut. Separarea ar fi posibilă fie prin rotaţia ADN, fie prin derularea ARN în jurul ADN. Prima variantă este puţin probabilă, deoarece ARN este legat cu ribosomii şi cu catenele proteice nascente, formând un complex masiv. Probabil că segmentele de ADN transcrise conţin incizii monocatenare, care le permit rotaţii pentru a se separa de ARN.

Transcrierea moleculei de ARNm durează circa 1 minut. Rata traducerii este controlată de rata transcrierii. Cele două procese sunt intim corelate şi se petrec cvasisimultan.

Pe medii nutritive bogate, cele mai multe celule bacteriene sintetizează şi secretă *exoproteine,* în special în faza staţionară a culturii. Proteinele pentru "export" se sintetizează pe ribosomii atasaţi membranei plasmatice.

Secreţia proteinelor extracelulare la bacterii

Termenul de "secreţie" semnifică trecerea unei molecule de la locul sintezei sale (citoplasma), prin membrană, la exteriorul celulei Gram pozitive sau în spaţiul periplasmic al celulei Gram negative, iar cel de "translocaţie" semnifică transferul extracitoplasmatic al unei molecule care rămâne legată de membrană.

Toate celulele, eucariote şi procariote, secretă (exportă) proteine în spaţiul extracelular sau prin translocaţie le deplasează la nivelul membranei, unde rămân ancorate ca proteine funcţionale.

Proteinele pentru *export,* la bacterii se sintetizează pe ribosomii asociaţi membranei plasmatice. Sinteza începe cu o *secvenţă semnal,* de 18-35 aminoacizi, la capătul amino-terminal. Prin secvenţa peptidică semnal, proteinele pentru export se deosebesc de cele citoplasmatice şi se orientează spre calea de export. Orientarea este rezultatul legării peptidului semnal, de membrană, fie direct, fie prin intermediul unui component citoplasmatic solubil.

Unele proteine destinate exportului nu apar niciodată în citoplasmă, ceea ce sugerează că eliminarea lor se face pe măsură ce sunt sintetizate. Ele sunt molecule relativ mici (20-40 kD) şi sunt lipsite de rigiditate, nu au legături S-S şi, de cele mai multe ori, nici componentă glucidică. Pentru această categorie de proteine, translocaţia este cotranslaţională. Secvenţa semnal hidrofobă amino-terminală se angajează în traversarea membranei, înainte ca restul moleculei să fie sintetizată. După ce secvenţa semnal ajunge pe suprafaţa externă a membranei plasmatice, este clivată şi digerată.

Translocaţia nu este însă strict cuplată cu traducerea, deoarece molecula proteică nascentă rămâne între ribosom şi membrană, cu o lungime importantă. Sinteza este mai rapidă decât translocaţia. De aceea, transferul moleculei continuă câteva minute, după blocarea sintezei cu cloramfenicol.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Alte molecule se sintetizează complet, înainte de începerea exportului. După terminarea sintezei, moleculele destinate exportului nu dobândesc configuraţia terţiară în citoplasmă, deoarece factori proteici denumiţi *chaperoni* blochează plierea lor, astfel încât proteinele sunt menţinute într-o configuraţie parţial nepliat ă, compatibilă cu transferul. Prevenirea plierii este o etapă esenţială pentru exportul proteinelor, deoarece, dacă molecula proteică dobândeşte structura sa terţiară definitivă, nu mai poate fi exportată.

Molecula precursoare este orientată spre situsul său membranar specific, prin intermediul peptidului semnal, al chaperonului sau al ambelor tipuri de molecule.

Secvenţa peptidică semnal (leader) este clivată de o peptidază, în timpul translocaţiei. După translocaţie şi clivaj, adeseori, proteinele exportate rămân asociate membranei, până ce plierea este completă.

Proteinele structurilor de înveliş sunt sintetizate deasemenea, pe polisomii ataşaţi membranei citoplasmatice. Pe măsură ce sunt sintetizate, catenele peptidice nascente sunt transferate în grosimea membranei. Unele se termină în membrana internă, iar altele în spaţiul periplasmic sau în membrana externă.

Chiar şi fosfolipidele apar iniţial în membrana internă şi ulterior difuzează spre membrana externă.

La bacteriile Gram negative, translocaţia este un proces complex, deoarece moleculele trec în spaţiul periplasmic, printr-un proces dependent de energie. O proteină de translocaţie (Sec A) localizată, se pare în membrană, leagă şi hidrolizează ATP. Energia eliberată este utilizată pentru iniţierea translocaţiei prin membrana citoplasmatică. Cele mai multe proteine secretate de bacteriile Gram negative, rămân în spaţiul periplasmic şi au o semnificaţie metabolică (sunt enzime degradative). Majoritatea sunt proteaze şi furnizează nutrienţi asimilabili pentru celulă. Membrana externă a peretelui celular nu are sursa de energie necesară excreţiei. Din această cauză, o proteină translocată în spaţiul periplasmic printr-un proces dependent de energie, nu poate fi translocată printr-un mecanism similar, prin membrana externă. Probabil, intervin proteine specifice de translocaţie ale membranei externe.

La bacteriile Gram pozitive, proteinele destinate membranei citoplasmatice şi peretelui celular se sintetizează fără secvenţe semnal. Prin analogie cu exportul proteinelor la *E. coli*, proteinele membranei citoplasmatice sunt integrate spontan, prin interacţiuni ionice şi hidrofobe.

Tulpinile g. *Bacillus* sunt cele mai utilizate pentru producerea industrială a exoproteinelor. De aceea, mecanismul sintezei proteinelor s-a studiat la tulpinile acestui gen. Se secretă în special enzime degradative: proteaze, amilaze, RN-aza, levan-sucraza.

Proteinele de export se sintetizează cu o secvenţă semnal, de 18-35 aminoacizi, cu capătul amino încărcat pozitiv, urmat de o secvenţă hidrofobă. Sinteza exoproteinelor are loc pe ribosomii asociaţi membranei citoplasmatice. Mecanismul de export al exoproteinelor, la *B. subtilis* este, probabil, asemănător cu cel de la *E. coli*.

La *B. subtilis*, proteinele translocate prin membrană sunt supuse clivajului secvenţei semnal şi rămân legate de peretele celular sau sunt eliberate în mediul extern.

Mecanismul de export al exoproteinelor este complicat de faptul că, la unele specii de *Bacillus* (dar nu *B. subtilis)*, la exteriorul peptidoglicanului se găseşte un strat proteic. Un astfel de strat proteic nu este tipic numai celulelor Gram pozitive, deoarece este prezent şi la numeroase tulpini Gram negative. Stratul proteic este prevăzut cu pori, care permit trecerea proteinelor.

Unele proteine se sintetizează cu o secvenţă suplimentară de aminoacizi, localizată între peptidul semnal şi proteina propriu-zisă, denumită *propeptid*. Unele propeptide sunt lungi, altele scurte. Cele lungi sunt caracteristice proteazelor. Exoproteazele la *B. subtilis* sunt sintetizate ca *preproenzime*, adică au atât secvenţa semnal, cât şi propeptidul. Propeptidul pare a avea mai multe funcţii:

- uşurează excreţia moleculei de exoprotează;
- împiedică activarea enzimei în timpul secreţiei;
- leagă proteaza de membrana citoplasmatică.

Datorită secvenţei propeptidului, la procariote, proteazele, asemănător celor de la eucariote, sunt secretate sub forma inactivă, ca *zimogen*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Propeptidele scurte sunt formate din câteva resturi de aminoacizi. Funcţia lor nu se cunoaşte. După translocaţie, exoproteinele sunt eliberate în mediu cu propeptidele scurte ataşate, dar clivajul lor survine imediat.

Nucleoidul bacterian

Materialul genetic bacterian este reprezentat de două tipuri de structuri: *nucleoidul*, care din punct de vedere structural şi funcţional corespunde *cromosomului*, iar cea de a doua categorie de structuri o reprezintă *plasmidele*. Corespunzător celor două tipuri de structuri, determinanţii genetici sunt de două categorii: *gene esenţiale (*eucromosomale), localizate în structura cromosomului şi *genele accesorii*, cu localizare plasmidială sau în structura elementelor genetice transpozabile şi a unor fagi.

Cromosomul bacterian, ca structură genetică esenţială poartă informaţia genetică ce asigură desfăşurarea funcţiilor esenţiale pentru existenţa celulei, adică setul de determinanţi minim necesari pentru a codifica arhitectura celulei şi pentru a asigura metabolismul energetic şi de biosinteză, creşterea, diviziunea şi reglarea diferitelor activităţi celulare.

Structurile genetice extracromosomale (plasmidele) poartă informaţia genetică accesorie, "de confort", care permite celulei o mai bună adaptare la condiţii de mediu, noi sau modificate.

Spre deosebire de celulele eucariote care au un nucleu cu structură bine definită, delimitat de o membrană şi conţinând un număr definit de cromosomi, "nucleul" bacterian reprezintă o formă primitivă de organizare, lipsită de membrană, inclavată direct în citoplasmă. Particularitatea structurii nucleare – lipsa membranei delimitante – este fundamentală pentru organizarea celulară de tip *procariot*, căruia îi aparţin bacteriile.

Datorită caracterelor structurale particulare, "nucleul" bacterian a primit diferite denumiri: *nucleoid, material nuclear, nucleoplasmă, echivalent nuclear* sau chiar *nucleu*, prin analogie cu nucleul celulei eucariote, *lineom* sau *genofor*

Evidenţiere. Fiind foarte bogată în ARN, citoplasma celulei bacteriene este intens bazofilă, fapt ce nu a permis diferenţierea materialului nuclear, la fel de bazofil, după colorarea cu coloranţi bazici de anilină. De aceea s-a considerat că nucleul bacterian lipseşte sau dimpotrivă, că bacteriile ar avea un nucleu imens care ocupă întreaga celulă. Datorită bazofiliei citoplasmei, evidenţierea materialului nuclear la microscopul optic este posibilă după utilizarea tehnicilor de *colorare selectivă*, ce constau în îndepărtarea ARN prin hidroliză acidă (tehnica Robinow şi Feulgen) sau enzimatică (cu ribonuclează) şi utilizarea coloranţilor de anilină.

După hidroliza ARN, materialul nuclear apare sub diferite forme: sferică, ovalară, de halteră, de bastonaş, reprezentând 5-16% din volumul celulei.

După tratamentul celulelor cu DN-ază, zona corespunzătoare materialului nuclear apare golită de conţinut.

Pe micrografiile electrono-optice, materialul nuclear este localizat, în mod obişnuit, în partea centrală a celulei şi se distinge de citoplasma înconjurătoare, prin densitatea sa mai mică la fluxul de electroni, în contrast cu celula eucariotă, la care nucleul este mai electronodens, comparativ cu citoplasma. Celula procariotă are un *contrast invers* al structurilor sale, în raport cu celula eucariotă, care se datorează atât faptului că *ADN nu este asociat cu proteine*, cât şi *densităţii foarte mari a citoplasmei bacteriene*.

Pe secţiuni ultrafine, zona materialului nuclear este ocupată de fibrile fine, cu diametrul de 2,5 nm, uneori aranjate în şiruri ondulate, paralele, asemănătoare cu o jurubiţă de aţă şi sunt sensibile la hidroliza cu DN-ază.

Organizarea fizică a cromosomului

Materialul nuclear poate fi izolat din celulă sub forma unui *corpuscul dens* şi compact. După tratatamentul cu RN-ază, din corpusculul dens se eliberează cromosomul circular, format dintr-o singură moleculă de ADN, circulară, închisă covalent, cu o lungime de 1400 μm şi diametrul de 2,5 nm, corespunzător diametrului moleculei de ADN dublu catenar. Circularitatea este o condiţie a existenţei sale. Sub această formă, molecula de ADN este rezistentă la acţiunea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

exonucleazelor citoplasmatice, active asupra moleculelor lineare de ADN. Cromosomul bacterian este cea mai mare moleculă biologică. Prin lungimea sa (1400 μm), molecula de ADN cromosomal depăşeşte de circa 1000 de ori lungimea celulei bacteriene.

Corpusculul dens corespunde stării "împachetate" a cromosomului. După tratamentul moderat cu RN-ază şi proteaze, din structura compactă se izolează ADN (60%), ARNm , ARNt (30%) şi ARN-polimeraza (10%).

Raportată la dimensiunile mici ale unei bacterii, molecula de ADN este supusă constrângerilor topologice de *supraspiralizare(suprarăsucire)*, prin care este "împachetată" pentru a forma un corp compact de 1500 de ori mai mic.

Pentru a ocupa un volum atât de mic, molecula de ADN se împachetează după norme foarte riguroase, aşa încât, în orice moment, din cele 3000-5000 de gene pe care le conţine, oricare să fie accesibilă sistemelor celulare de transcriere şi traducere.

Moleculele de ARN au un rol esenţial în menţinerea stării compacte a ADN. S-au propus mai multe modele de împachetare a moleculei de ADN. Cel mai acceptat este acela propus de Pettijohn şi Hecht (1974), în acord cu care, împachetarea se face printr-un proces de *pliere şi supraspiralizare* (formare de suprahelice). Se formează astfel o structură condensată, menţinută prin acţiunea asociată a proteinelor din nucleoid.

Modelul de împachetare prin pliere şi supraspiralizare încearcă să explice mecanismul molecular al drumului invers, de la structura circulară relaxată a macromoleculei de ADN, la arhitectura corpusculului dens existent în celulă.

Pentru împachetare se consideră că molecula dublu catenară, circulară, se pliază iniţial, în 40-60 de *domenii* egale. Punctele de pliere sunt determinate de molecule de ARN născânde, legate cu una din extremităţi de ARN-polimerază. Moleculele de ARNr şi ARNt, împreună cu ARN-polimeraza, participă la formarea şi menţinerea domeniilor de pliere. Prin pliere, diametrul cromosomului scade la circa 30 μm. În interiorul fiecărui domeniu de pliere are loc un proces de *supraspiralizare*. Supraspiralizarea este o stare fizică, în care molecula de ADN se pliază prin răsucire în jurul axei sale. Astfel, între cele două capete ale domeniului se creează o *tensiune de torsiune*, direct proporţională cu gradul de spiralizare ce se menţine atâta timp cât molecula de ADN are o configuraţie covalent închisă. Secţionarea uneia dintre catene are ca rezultat anularea supraspiralizării şi a tensiunii de torsiune.

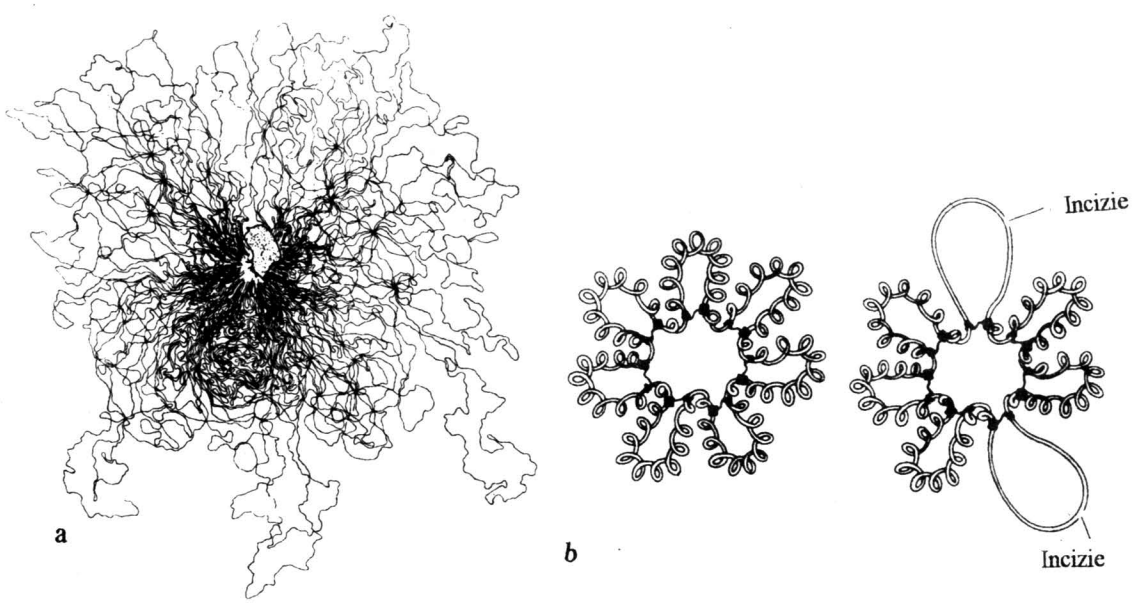


Fig. 27. Diferite stări fizice ale cromosomului bacterian. a. Bucle multiple de ADN dintr-o celulă spartă prin şoc hipotonic, răspândite pe suportul reprezentat de o proteină bazică. b. Diagrama ADN supraspiralizat. În stânga sunt reprezentate 7 domenii (numărul real este de circa 50) supraspiralizate, menţinute astfel de un set de proteine, care stabilizează capetele unui domeniu. Buclele mici ale fiecărui domeniu pot fi spiralizate în jurul unui set de proteine nucleosomale, reducând tensiunea în dublul helix, creată prin supraspiralizare. În dreapta, două domenii au fost incizate la nivelul unei catene, permiţând rotaţia helixului şi relaxarea supraspiralei (după Pettijohn şi Sniden, în „Molecular Cytology of *Escherichia coli*", Ed. Nanninga, Acad. Press, 1985, citat Davis, 1990).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Într-o etapă ulterioară, domeniile suprahelicale de pliere, se pliază din nou unul faţă de altul, superior şi inferior faţă de un plan orizontal. Astfel, rezultă masa compactă a nucleoidului, aşa cum se evidenţiază la microscopul optic şi se poate izola din celulă.

Spiralizarea ADN are sens *pozitiv* şi *negativ*. Spiralizarea primară a dublului helix are sens pozitiv, iar cea secundară (supraspiralizarea) are sens negativ, adică se produce prin răsucirea moleculei de ADN în sens opus spiralizării primare a dublului helix

Prin supraspiralizarea negativă, se creează o tensiune de torsiune între capetele domeniului pliat, care este diminuată prin formarea buclelor de ADN. Odată cu formarea unei bucle se elimină un tur al suprahelicei şi tensiunea scade.

Formarea superhelicei este condiţionată de activitatea unui set de enzime, denumite ADN-*topoizomeraze*. Topoizomerazele sunt enzime care schimbă configuraţia spaţială a ADN prin ruperea şi reunirea catenelor în absenţa cofactorului energetic. Unele topoizomeraze sunt *helicaze* (produc spiralizarea moleculei de ADN), iar altele sunt *derulaze* (produc despiralizarea prin incizia unei catene şi bucla se relaxează).

Ryter şi Cohen (1975) consideră că nucleoidul evidenţiat la microscopul electronic ca o structură netă ar reprezenta fracţia de ADN condensat, *genetic inactivă*, care din punct de vedere topologic[1] reprezintă ADN supraspiralizat.

Proporţia între ADN supraspiralizat şi ADN relaxat este menţinută prin echilibrul dintre *ADN-giraza* (topoizomeraza II), enzima care produce supraspiralizarea şi topoizomeraza I, enzima care produce *relaxarea*.

Topoizomeraza I, prin clivarea unei catene, elimină tensiunea de torsiune şi formează bucle externe distribuite pe toată suprafaţa nucleoidului. Buclele sunt secvenţele de ADN care conţin genele transcrise la un moment dat. Ele sunt invizibile, extinse în citoplasmă şi în această topografie sunt mai uşor accesibile ADN-polimerazei şi ribosomilor. Pe secţiuni subţiri, anticorpii marcaţi cu aur, specifici faţă de ADN monocatenar, colorează numai periferia nucleoidului, iar anticorpii specifici faţă de ADN dublu catenar, colorează partea centrală (condensată) a nucleoidului.

Domeniile cromosomului bacterian sunt *topografic independente*, ceea ce permite rotaţia lor liberă şi relaxarea individuală a fiecărei supraspirale, care trece reversibil în *starea de buclă*, configuraţie în care *se replică, este transcrisă sau reparată*. ADN bacterian, ca şi la eucariote este asociat cu proteine.

In celula eucariotă, corpii proteici în jurul cărora se spiralizează dubla catenă de ADN se numesc *nucleosomi*. La bacterii, organizarea moleculară a nucleosomilor nu este cunoscută. Se pare că ei conţin două proteine de legare pentru ADN: proteina HU (*H*elix *U*nwinding) şi proteina I. Ele se găsesc în structura nucleoidului, în proporţia de o moleculă la 150-200 perechi de baze.

Bacteriile au o cantitate mică de ADN *neinformaţional*. La numeroase bacterii s-au evidenţiat câteva sute de secvenţe palindromice de 20-40 de baze, care delimitează unele gene şi a căror funcţie nu este cunoscută. La bacterii nu s-au găsit gene înădite. Comparând secvenţele genelor ce codifică proteine bine conservate în evoluţie, reiese că intronii au fost prezenţi în genele ancestrale, dar s-au pierdut în evoluţia organismelor care s-au adaptat la o creştere foarte rapidă (eubacterii şi levuri).

In mod obişnuit, în celula bacteriană se găseşte un singur cromoson, dar în culturi tinere, pe medii care oferă condiţii optime de creştere, celulele apar multinucleate, având 2-4 cromosomi, identici genetic, deoarece provin prin replicarea cromosomului parental, astfel că, în esenţă, bacteriile sunt organisme haploide. Situaţia de celulă polinucleată este temporară şi este rezultatul lipsei de sincronizare între procesele de diviziune nucleară şi diviziune celulară.

Replicarea ADN bacterian

Replicarea cromosomului bacterian este un proces strict reglat şi are loc într-o etapă bine definită a ciclului celular.

[1] Topologia este o ramură a matematicii care studiază proprietăţile corpurilor geometrice care rămân nealterate, după răsucirea şi contorsionarea lor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Replicarea ADN bacterian este de tip *semiconservativ*: fiecare din cele două molecule fiice conţine o catenă sintetizată *de novo* şi o catenă complementară, conservată din molecula parentală.

Pentru ca replicarea ADN să aibă loc, cele două catene ale moleculei parentale trebuie să se separe fizic, pentru a permite ADN-polimerazei şi proteinelor asociate să citească fiecare catenă individuală cu rol de matriţă.

Procesul replicării moleculei de ADN este iniţiat la un punct denumit *originea replicării*. Aceasta este o secvenţă de 250-300 de baze, recunoscută de complexul de iniţiere. La punctul de origine a replicării, dubla catenă de ADN este secţionată şi replicarea este iniţiată pe cele două catene izolate. Situsul de replicare, denumit *bifurcaţie de replicare*, se deplasează bidirecţional, pe molecula de ADN.

Complexul proteic de replicare este format din *proteina A* (cu rol în legarea cromosomului pe situsul membranar), *helicaza B* –o topoizomerază I (cu rol de despiralizare a ADN), *proteina SSB* (*s*ingle *s*trand *b*inding) cu rolul de a stabiliza cele două catene separate, *ADN giraza* (topoizomeraza II), ce limitează derularea extensivă a ADN sub acţiunea topoizomerazei I. Aceste proteine, împreună cu *G-primaza* (cea care sintetizează ARN primer) formează un *primosom* (complexul primar care iniţiază replicarea).

Deoarece replicarea moleculei de ADN este bidirecţională, există două puncte de sinteză, denumite *bifurcaţii de replicare*, care se deplasează în direcţii opuse pe cromosom, începând de la punctul de origine. Pe imaginile autoradiografice se observă structuri de forma literei theta (θ).

Replicarea ADN are caracter cooperant, adică complexul de proteine implicate în replicare formează un ansamblu stabil care se deplasează de-a lungul fiecărei catene, fără disociere şi reasociere la fiecare treaptă, ceea ce contribuie decisiv la viteza foarte mare a replicării ADN.

Enzima care catalizează adăugarea nucleotidelor este ADN-polimeraza III.

Replicarea ADN este *semidiscontinuă*: o catenă a ADN este sintetizată continuu, iar cealaltă se sintetizează sub forma unor fragmente scurte, care ulterior sunt reunite cap la cap. Cele două catene ale moleculei parentale nu se replică simultan, deoarece sunt *antiparalele* (una are direcţie 5'→ 3', iar cealaltă, 3'→ 5'). Direcţia de polimerizare a catenei noi este 5'→ 3', nici una din polimeraze neputând să adauge dezoxiribonucleotide în direcţia 3'→ 5', la catenele nascente.

Catena care creşte în direcţia 5'→ 3' (catena leading) se sintetizează în mod *continuu*, deoarece, permanent există un capăt 3'OH liber la bifurcaţia de replicare, la care se adaugă o nouă nucleotidă. ADN-polimeraza III catalizează adăugarea unei nucleotide la catena de ADN preexistentă, dar nu iniţiază sinteza ADN *de novo*, dintr-un amestec de nucleotide. Totdeauna este necesar un *primer de ARN*. La deschiderea dublei catene de ADN, o ARN-polimerază catalizează sinteza unui primer de ARN. ARN-polimeraza specifică se numeşte *ARN-primaza*.

Catena care creşte în direcţia 3'→ 5' se sintetizează *discontinuu*, deoarece la bifurcaţia de replicare nu există un capăt 3'OH liber. Mici fragmente de ARN primer furnizează capătul 3'OH. Aceasta este catena *succesoare sau întârziată (lagging)*. Ea se sintetizează sub forma unor fragmente scurte în direcţia opusă bifurcaţiei de replicare.

După ce ADN este sintetizat, primerii ARN sunt îndepărtaţi (probabil sub acţiunea RN-azei H). Fragmentele scurte rezultate din sinteza discontinuă sunt completate de ADN-polimeraza I şi reunite cap la cap, sub acţiunea catalitică a *polinucleotid-ligazei*.

Deoarece o catenă este sintetizată continuu, iar cealaltă discontinuu, întregul proces al replicarii ADN are caracter discontinuu.

Pentru un scurt interval după replicare, catena parentală şi cea progenă diferă din punct de vedere chimic, deoarece catena parentală este *metilată*. Această diferenţă de ordin chimic este utilă pentru corectarea fidelităţii copierii catenei matriţă (funcţia de *proof-reading*). Astfel, catena nouă este controlată pentru eventualele împerecheri greşite ale nucleotidelor. Eventualele erori de împerechere sunt depistate de *sistemul enzimatic de corectare*, sunt clivate, după care o enzimă de reparare încorporează nucleotidele corecte.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

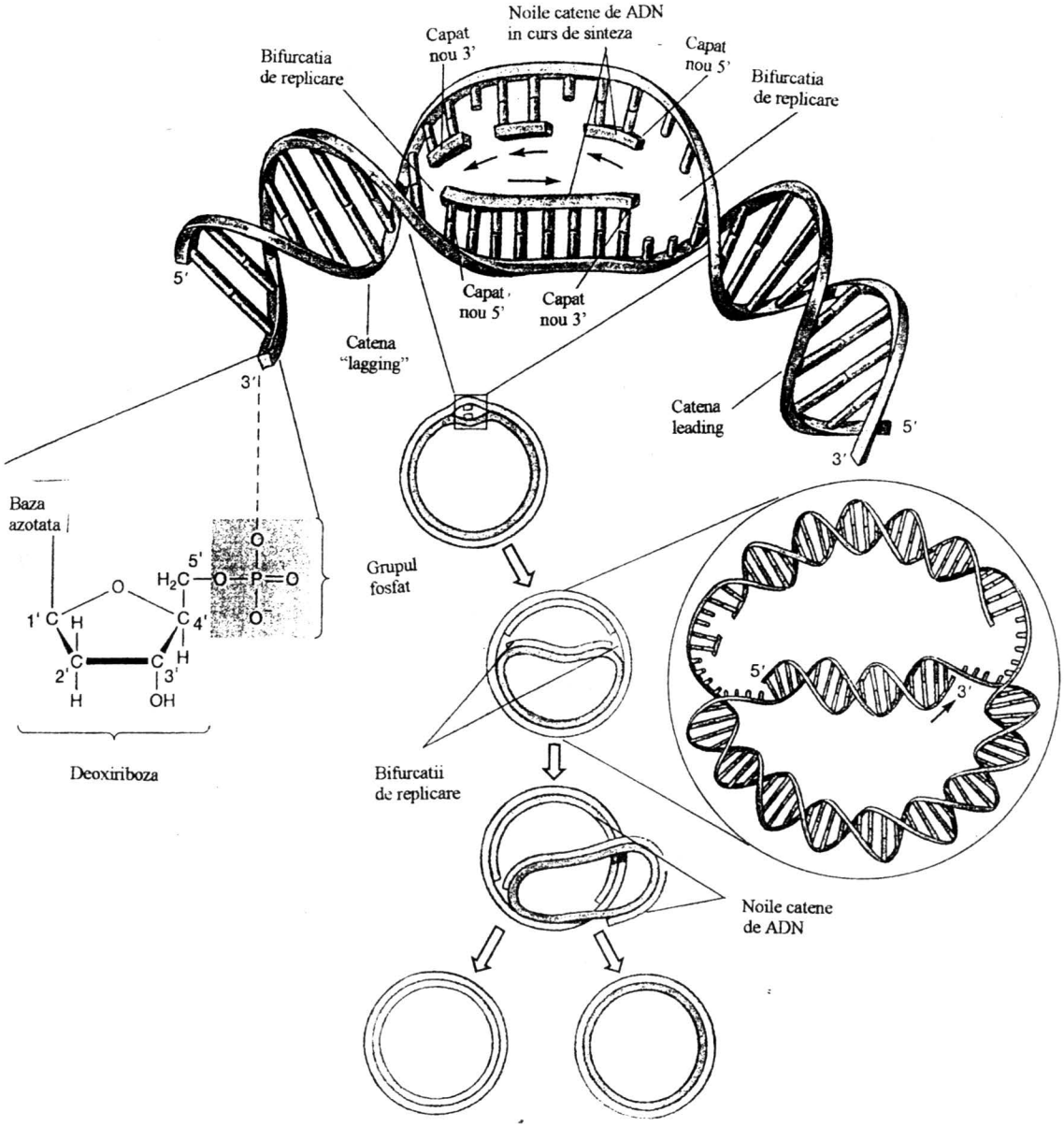


Fig. 28. Pentru replicarea ADN la procariote, catenele se separă la punctul de origine a replicării, de unde bifurcaţia de replicare se deplasează simetric. Fiecare din cele două catene parentale are rol de matriţă pentru sinteza unei catene complementare. Sinteza noilor catene de ADN are loc în direcţia 5'→3'. De aceea, sinteza unei catene este discontinuă, sub forma segmentelor scurte (Okazaki) şi apoi reunite.

ADN-metilazele metilează adenina şi citozina şi inhibă astfel acţiunea enzimelor de restricţie.

Cele mai importante schimbări ale ADN în cursul replicării sunt acelea ale gradului de spiralizare, produsă sub acţiunea topoizomerazelor. ADN suprahelical se despiralizează mai uşor decât moleculele cu un grad inferior de spiralizare.

Deoarece topoizomerazele reglează nivelul de supraspiralizare, ele sunt de fapt reglatoare ale proceselor de replicare şi transcriere.

Sporul

Sporul este o formă primitivă de diferenţiere celulară, care constă în formarea în celula vegetativă, a unui nou tip de celulă, cu proprietăţi structurale şi funcţionale noi.

Sporii se formează la bacteriile cilindrice: totdeauna la bacilii anaerobi din g. *Clostridium* şi la actinomicete, facultativ la cei aerobi din g. *Bacillus* şi excepţional la coci

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(*Sporosarcina*). Toate bacteriile sporulate sunt Gram pozitive. Sporularea este condiţionată de capacitatea celulelor de a forma un perete gros.

Există circa lo tipuri de spori, ce se deosebesc prin modul de formare, prin structură şi prin rezistenţă la factorii de mediu. Cel mai caracteristic este *endosporul*, denumit astfel deoarece se formează în interiorul unei celule vegetative. La actinomicete se formează câteva tipuri de spori: artrospori (prin segmentare), oidiospori (prin fragmentare), aleuriospori (se formează apical sau lateral pe sporofori scurţi), zoospori (spori mobili), iar aplanosporii se formează prin septarea hifelor şi sunt menţinuţi în interiorul unui înveliş. La *Azotobacter* se formează *chişti*.

Endosporul sau sporul endogen a fost considerat ca unic tip sporal bacterian, până la descrierea celorlalte tipuri. Are formă sferică sau ovalară. Cei ovalari au dimensiuni cuprinse între 0,5 – 1 μm, pentru axul scurt şi 1,2 – 2 μm pentru axul lung.

Evidenţiere. Endosporul are o refringenţă deosebită şi pe preparatul proaspăt apare strălucitor. Este foarte greu colorabil, datorită învelişurilor sporale groase, greu penetrabile pentru coloranţi (în special cortexul) şi datorită conţinutului lor chimic particular. Se colorează prin tehnici speciale.

Poziţia sporului în celulă poate fi terminală, subterminală sau centrală. În funcţie de dimensiunile sporului faţă de diametrul celulei vegetative, sporii sunt *deformanţi* (diametrul lor este mai mare decât al celulei) şi *nedeformanţi* (diametrul lor este mai mic decât al celulei).

Într-o celulă bacteriană sporulantă, sporii sunt unici. Există excepţii rare: în sol apar bacterii bisporulate, iar în intestinul unor vertebrate aquatice, bacterii polisporulate. Semnificaţia sporilor multipli nu este clară. Se pare că ei apar ca rezultat al perturbării mecanismului de separare a celulelor după diviziune. Sporii multipli apar în celulele în care materialul nuclear s-a replicat, dar nu s-a format septul de diviziune.

Sporogeneza este declanşată în mod obişnuit, de lipsa unui nutrient esenţial în mediu, sursa de azot sau de carbon. Procesul este foarte complex din punct de vedere genetic, biochimic, structural şi funcţional.

Sporularea implică activarea unui număr mare de gene (peste 50) sporale, inactive în celula vegetativă. Sub aspect biochimic, sporularea este însoţită de modificări majore ale componentelor. Apar proteazele care măresc turnover-ul proteic, furnizând aminoacizii necesari sintezei proteinelor noi. Din punct de vedere funcţional, celula sporală dobândeşte o rezistenţă deosebită la factorii fizici şi chimici.

Din punct de vedere structural, la nivel electrono-optic, sporularea la *B. subtilis* parcurge 7 stadii, în cursul cărora celula sporală se formează şi se eliberează. Sporularea este precedată de replicarea materialului nuclear. Ulterior, cei doi cromosomi fuzionează, formând o structură axială alungită unică. Nucleoidul axial diploid segregă în două structuri cromosomale: una migrează spre polul sporal şi va deveni nucleoidul sporului, iar cealaltă rămâne în celula vegetativă.

Formarea septului sporal este iniţiată prin apariţia a două mici protuberanţe simetrice ale peretelui, spre interiorul celulei. Membrana citoplasmatică îmbracă aceste excrescenţe, se invaginează şi formează membrana presporului. Cele două invaginări ale membranei se închid ca o diafragmă, de la exterior spre interior. Membrana presporului este dublă şi delimitează componentele celulare ale viitorului spor. Formarea sa este completă la 5 ore după iniţiere.

În stadiile ulterioare, din materialul care se depune între cele două membrane ale presporului, se definitivează morfogeneza *cortexului*, format din trei lamele: *lama internă* (profundă), care, după germinare va deveni peretele sporului şi al viitoarei celule, *lama intermediară sau cortexul* propriu-zis, cu grosime variabilă şi *lama externă*.

S-au izolat mutante bacteriene care blochează sporogeneza în diferite etape.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

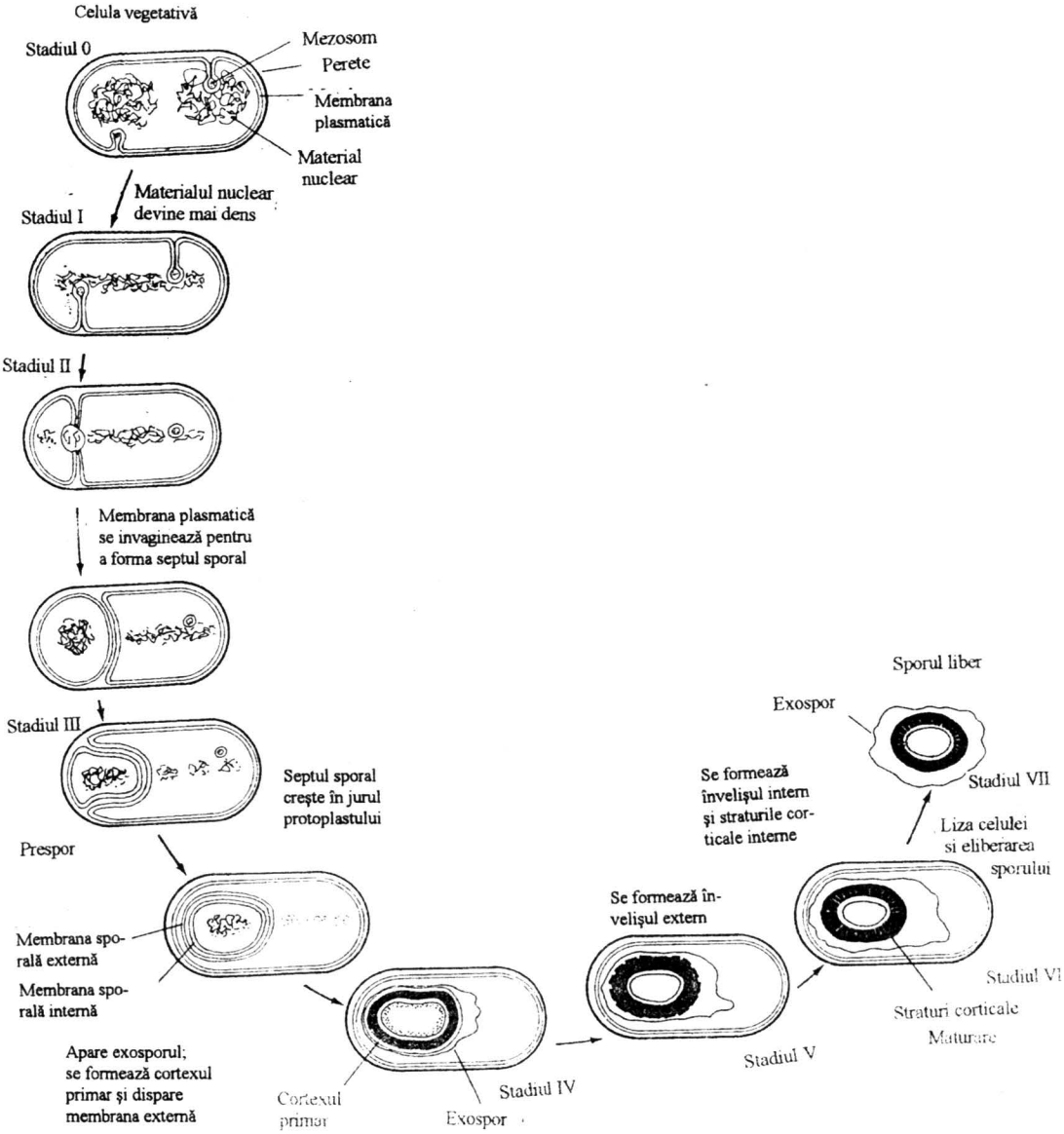


Fig. 29. Reprezentarea schematică a etapelor de formare a endosporului (după Brook, 1988).

Structura internă a endosporului

La diferite grupe de bacterii există variaţii importante ale structurii sporului, în special în privinţa învelişurilor, care diferă prin numărul şi grosimea lor. Există deasemenea variaţii cu privire la relaţia sporului cu celula vegetativă în care s-a format: sporul rămâne inclus în celulă sau se eliberează curând după formare, prin liza acesteia.

Sporul este alcătuit din *protoplastul sporal*, care conţine *sporoplasma* şi *materialul nuclear*. Protoplastul sporal este acoperit de următoarele structuri:

- *un perete intern* subţire, originar din membrana internă a presporului. După germinare, acesta va forma peretele celulei vegetative;
- *cortexul sporal,* cu grosime variabilă, electronoclar. Este o structură multilaminară ce se formează pe feţele adiacente ale celor două membrane ale presporului;
- *stratul extern* al cortexului, derivat din membrana externă a presporului;
- *învelişul sporal intern (intina)*, un strat dens, de natură proteică;
- *învelişul sporal extern (exina)*. Uneori, aceste două învelişuri sunt pluristratificate;
- *exosporul,* un rest al celulei vegetative, uneori adiacent de celelalte învelişuri sporale, prin intermediul filamentelor "suspensoare".

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La unele categorii de spori se găsesc structuri suplimentare denumite *apendice sporale*. Semnificaţia lor funcţională nu este certă, dar ar putea fi implicate în dispersarea sporilor în natură sau ar facilita absorbţia substanţelor nutritive în perioada premergătoare germinării sporului.

Particularităţile biochimice ale sporului

Protoplastul sporal conţine toate categoriile de molecule necesare reluării creşterii: materialul nuclear şi cantităţi mici ale fiecărui component al aparatului de sinteză proteică (ribosomi, ARNt, enzime). Lipsesc componentele celulare instabile (ARNm şi nucleozid-trifosfaţii), dar există precursorii lor mai stabili (nucleozid mono- şi difosfaţi). Aminoacizii şi enzimele lor de biosinteză sunt virtual absente, dar la germinare, ambele tipuri vor fi generate prin hidroliza proteinelor de depozit, solubile, cu moleculă mică.

Puţine enzime sporale derivă din enzimele celulei vegetative prin clivare. Majoritatea enzimelor sporale sunt noi. Sinteza lor este codificată de gene activate în timpul sporulării. Toate enzimele sporale sunt termorezistente, fapt explicabil prin dimensiunile lor mici, fiind reprezentate numai de situsul activ al moleculei respective. Lipsesc enzimele fundamentale ale metabolismului celular, ca şi sistemele transportoare de electroni.

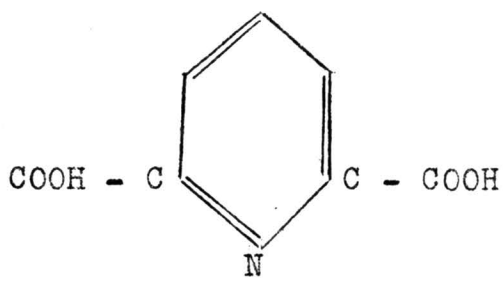


Fig. 30. Acidul dipicolinic.

La cele mai multe bacterii, ionii de Ca lipsesc. În stadiile timpurii ale sporulării apar sistemele de transport activ pentru Ca. Ionii de Ca sunt legaţi cu o cantitate echivalentă de *acid dipicolinic* (se formează din acidul diaminopimelic – un precursor al peptidoglicanului) şi formează dipicolinatul, care poate constitui circa 15% din greutatea uscată a sporului.

S-a considerat că sporul este rezultatul unui proces de deshidratare profundă. Cercetările ulterioare au evidenţiat că deosebirile dintre spor şi celula vegetativă nu sunt de ordin cantitativ, ci de ordin calitativ şi se referă la *starea apei*. În celula vegetativă, apa liberă reprezintă 70% din cantitatea totală, iar în spor oscilează între 3-10%, restul de 90-97% fiind *apa legată*. Din această cauză, sporul este lipsit de metabolism sau are un metabolism de intensitate foarte mică, nedecelabilă. Celula sporală este vie, dar procesele vieţii sunt *latente*. Fenomenul se numeşte *criptobioză* (viaţă ascunsă).

Consecinţa particularităţilor de compoziţie chimică, la care se adaugă învelişurile groase multiple şi pluristratificate este rezistenţa deosebită a sporului la *căldură*, la acţiunea *substanţelor chimice* (antiseptice, dezinfectanţi) şi a *radiaţiilor*. Rezistenţa termică este conferită de dipicolinatul de Ca. Mutaţiile care reduc cantitatea de dipicolinat diminuă rezistenţa sporului la agentul termic.

Rezistenţa termică a sporului impune o metodologie costisitoare de sterilizare, la temperaturi foarte ridicate. Uneori, sporii rezistă la temperatura de 180 grade, de la câteva minute, la câteva ore. De aceea s-a renunţat la metoda sterilizării obiectelor prin fierbere, deoarece tratamentul omoară numai formele vegetative, iar sporii rămân viabili.

Germinarea este procesul de conversie a sporului în celulă vegetativă şi decurge în trei stadii:

- activarea sporului prin deshidratare, asociată cu mărirea volumului;
- germinarea, adică modificarea localizată prin gelificare a învelişurilor sporale;
- emergenţa celulei vegetative din învelişuri, delimitată de un perete derivat din peretele sporal intern.

Într-un mediu nutritiv optim, germinarea este rapidă: de la iniţiere până la diviziunea celulară, procesul durează 90 de minute. În medii favorabile, majoritatea sporilor germinează, dar o proporţie mică rămân *dorminzi*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru iniţierea germinării, sporii necesită un factor suplimentar: termic, un compus cu grupări –SH, pH acid. După circa o oră de la începutul activării începe sinteza ADN.

Semnificaţia biologică a procesului de sporogeneză

Sporogeneza reprezintă o formă primitivă de diferenţiere celulară şi este o modalitate de adaptare a celulei bacteriene la condiţiile nefavorabile de mediu, prin *criptobioză*. Mecanismele criptobiozei sunt necunoscute. Unul dintre ele ar putea fi starea specială a enzimelor. Ele ar fi inactivate în mod reversibil. La rândul ei, inactivarea reversibilă poate fi determinată de trei factori:

- prin modificări fizico-chimice ale moleculelor enzimatice;
- prin acţiunea unor inhibitori ai activităţii enzimatice;
- prin lipsa unor metaboliţi esenţiali, care ar condiţiona starea normală, activă, a enzimelor.

Endosporul este o structură de conservare a viabilităţii celulelor dotate cu această capacitate de diferenţiere. Nu este o formă de multiplicare, exceptând cazurile rare ale bacteriilor bi- sau polisporulate.

Sporogeneza este asociată, la *B. subtilis*, cu producerea unor enzime proteolitice, iar la *B. thuringiensis*, cu producerea cristalelor proteice *parasporale*. Acestea sunt netoxice în stare nativă (pretoxine), dar devin foarte toxice după solubilizarea în mediul alcalin intestinal al larvelor de lepidoptere, coleoptere sau de ţânţar.

Endosporul are o longevitate excepţională: mii sau chiar sute de mii de ani. Sporii din rocile perioadei quaternare au germinat pe medii nutritive, *in vitro*.

Formarea sporilor de multiplicare la actinomicete

Actinomicetele sunt eubacterii care cresc sub forma unei reţele de filamente ramificate, denumită *miceliu coenocitic* (fără pereţi transversali).

Sporularea prin *fragmentare* este caracteristică g. *Actinomyces, Nocardia* etc. În faza staţionară de creştere, miceliul filamentos este fragmentat prin septuri transversale. Ulterior, fragmentele se eliberează sub forma unor structuri cilindrice, cu extremităţile tăiate în unghiuri drepte. În mediu favorabil, structurile germinează şi regenerează miceliul. Unele sunt incapabile de germinare, deoarece le lipseşte materialul nuclear.

Sporularea prin *segmentare* s-a studiat la *Streptomyces coelicolor*. Procesul se desfăşoară în câteva faze succesive:

- în hifele aeriene ale miceliului, zone succesive de nucleoplasmă se condensează devenind refringente;
- în jurul fiecărei condensări se diferenţiază structuri parietale şi rezultă spori. Şiragul de spori este menţinut în interiorul hifei parentale, denumită sporangiu;
- sporangiul hifal se sparge şi eliberează sporii.

Sporii multipli ai actinomicetelor au rol în diseminarea acestor organisme în mediu. Au învelişuri sporale mai simple şi sunt mai puţin rezistenţi, comparativ cu endosporul.

Sporularea, la actinomicete este asociată cu producerea substanţelor antibiotice.

Vacuolele cu gaz (aerosomii)

Vacuolele cu gaz sunt structuri refringente cu aspect ovalar, ce se găsesc la bacteriile fotosintetizante imobile, din mediile aquatice. Se identifică uşor, deoarece dispar după exercitarea unei presiuni asupra recipientului în care se află suspensia celulară.

La nivel ultrastructural s-a evidenţiat că vacuolele cu gaz sunt structuri compuse, adică sunt *compartimentate*. Atât membrana periferică a vacuolei cât şi cele de compartimentare, au o structură monostratificată ("non unit membrane") şi conţin numai molecule *proteice hidrofobe*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Vacuola cu gaz are un aspect striat (cu nervuri) şi este formată din cel puţin două tipuri de proteine: a)proteina principală, ale cărei molecule sunt ordonate după o distribuţie cristalină pe lungimea nervurilor, care formează teaca cilindrică şi capetele conice ale vacuolei; b)o proteină care aderă de exteriorul nervurii şi stabilizează structura.

Striaţiile (nervurile) apar atât pe faţa internă a structurii, cât şi la exterior. Ambele tipuri de proteine sunt *hidrofobe*. Lipsesc lipidele şi glucidele.

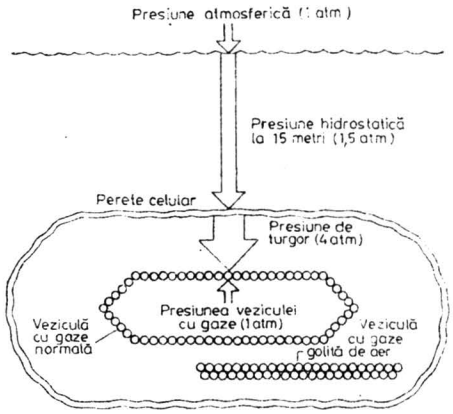


Fig. 31. Sursele de presiune care acţionează asupra veziculelor cu gaz într-o bacterie.

Vacuola cu gaz este liber-permeabilă pentru gaze şi nu se deformează sub presiunea lor. Spaţiul plin cu gaz rezultă din modul în care se asamblează moleculele proteice.

Compartimentele vacuolei se umplu rapid cu gaze, provenite din mediul extern, prin difuzie liberă. Membrana unistratificată este impermeabilă pentru lichide. Dacă presiunea ce se exercită pe suprafaţa vacuolei depăşeşte presiunea atmosferică (egală cu a gazului din interior), vacuola se sparge şi eliberează conţinutul.

Semnificaţie funcţională. Vacuolele cu gaz au rolul unor corpi de flotaţie. Când compartimentele ei sunt pline cu gaz, densitatea celulei scade sub nivelul densităţii apei şi astfel celula urcă spre straturile superioare. După pierderea conţinutului gazos, celula devine mai densă şi coboară spre straturile mai profunde ale apei. Faptul că vacuola este compartimentată permite *eliminarea fracţionată* a aerului şi în consecinţă, reglarea poziţiei celulei pe verticală, în funcţie de condiţiile de mediu. Astfel, se realizează deplasarea celulelor fotosintetizante imobile, ce trăiesc în apele stagnante. Când intensitatea luminii scade, celula urcă spre suprafaţa apei, iar când intensitatea luminii este prea mare, celula coboară în straturile mai profunde.

Vacuolele cu gaz protejează celula faţă de efectul nociv al radiaţiei UV, deoarece formează un ecran ce dispersează energia luminoasă. Vacuolele reglează raportul suprafaţă/volum celular. Ele sunt foarte numeroase la cianobacteriile care cresc cu o rată foarte mare şi produc fenomenul de "înflorire" a apelor.

Incluziile

Incluziile sunt structuri inerte, ce apar în celula bacteriană la sfârşitul fazei de creştere logaritmică.

După compoziţia chimică, incluziile sunt de trei tipuri:

- *polimeri organici polizaharidici* (amidon, glicogen), *lipidici* (poli-beta-hidroxi-butirat), *proteici*(incluzia parasporală la *B. thuringiensis*);
- *polimeri anorganici* (polimetafosfat sau volutină);
- *incluzii anorganice simple*, (sulf coloidal, $CaCO_3$).

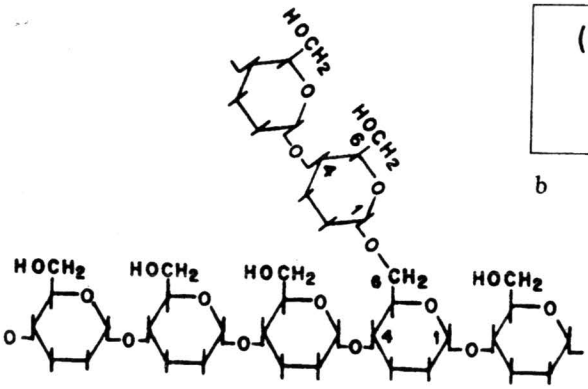
După criterii structurale, se disting:

- incluzii delimitate de membrane, ce au ca prototip pe cele de poli-β-hidroxibutirat;
- incluzii nedelimitate de membrane, au ca model pe cele de glicogen.

La microscopul optic, incluziile apar ca structuri granulare, cu formă neregulată, refringente(strălucitoare), cu dimensiuni de 50-100 nm.

Natura chimică a incluziilor se evidenţiază prin metode citochimice, cu coloranţi specifici. Soluţia Lugol colorează *amidonul* (poliglucozid neramificat) în albastru, iar *glicogenul* (poliglucozid ramificat) în brun. Incluziile de poli-β-hidroxibutirat se colorează cu negru de Sudan (ca şi depozitele de grăsimi neutre ale celulei eucariote) şi din această cauză ele au fost identificate incorect, ca rezerve lipidice. Incluziile *proteice* se colorează cu amido-schwarz, iar cele de *polimetafosfat* sunt *metacromatice* (se colorează roşu cu albastru de metilen).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

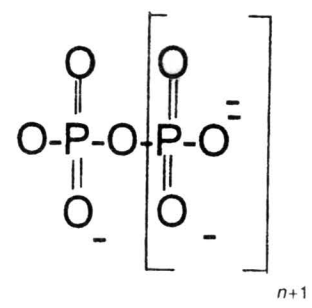


a

$(CH_3CHOHCH_2COOH)_n$

Acid poli-β-hidroxibutiric (PHB)

b



c Polifosfat

d

Fig. 32. Incluzii bacteriene. a. Formula structurală a glicogenului (molecule de glucoză legate α - 1,4, cu ramificații α - 1,6); b. Acidul poli-β-hidroxibutiric; c. Polifosfatul; d. Imaginea electrono-optică a incluziei proteice parasporale, la *Bacillus thuringiensis*.

Ca regulă generală, o specie bacteriană formează un singur tip de depozit celular.

Ca trăsătură distinctivă, incluziile de poli-beta-hidroxibutirat, la microscopul electronic relevă o structură lamelară concentrică, ce corespunde modului în care incluzia a crescut. Sinteza lor se face pe o cale laterală a sintezei acizilor graşi.

Granulele de *volutină* (polimetafosfat) sunt polimeri lineari de ortofosfaţi, cu lanţuri de lungime variabilă. Ele au fost evidenţiate la *Spirillum volutans*. Se formează în condiţiile deficitului oricăruia dintre nutrienţi. Polifosfatul se sintetizează prin adăugarea secvenţială a resturilor de fosfat, la pirofosfat, după reacţia:

$$P - P + ATP \rightarrow - P - P - P - + ADP;\ (- P -)_n + ATP \rightarrow (- P -)_{-n+1} + ADP$$

Degradarea polifosfatului urmează reacţia inversă şi furnizează ATP pentru celulă.

Incluziile de *sulf anorganic* sunt structuri refringente, cu diametrul de până la 1 μm. Pot fi localizate intracitoplasmatic sau la nivelul unor pliuri ale membranei plasmatice. Se văd la microscopul optic.

Incluziile de sulf anorganic apar la două grupe fiziologice de bacterii:

- la bacteriile sulfuroase purpurii (*Chromatiaceae*), care folosesc H_2S ca donor de electroni, în fotosinteză;
- la bacteriile filamentoase autotrofe nefotosintetizante (*Beggiatoa, Thiotrix*) care oxidează H_2S şi eliberează energia. La ambele grupe, acumularea S este tranzitorie. După epuizarea H_2S din mediu, S depozitat în celule este oxidat la sulfat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Semnificaţia biologică. Formarea incluziilor constituie o modalitate a celulei de a depozita cantităţi mari de materiale de rezervă. Ele se formează în condiţiile unui mediu bogat în substanţe nutritive, sau în cazul unui dezechilibru al compoziţiei chimice a mediului, în special al raportului C/N. Materialele de incluzie sunt consumate când mediul sărăceşte în compuşi nutritivi, sau când raportul C/N revine la normal.

Stocarea moleculelor sub forma polimerilor este o modalitate de păstrare a *echilibrului osmotic* între celulă şi mediu, deoarece prin polimerizare, moleculele devin inactive osmotic. Prin polimerizarea acidului beta-hidroxibutiric se evită acidifierea citoplasmei consectivă acumulării monomerilor. Grupările –COOH libere ale acidului beta-hidroxibutiric sunt anihilate prin formarea legăturilor *ester* între monomeri.

Incluziile *proteice* parasporale se sintetizează odată cu declanşarea procesului de sporogeneză.

Glicocalixul

Glicocalixul este reprezentat de totalitatea structurilor polizaharidice extraparietale: *capsula*, cu diferite grade de dezvoltare şi *glicocalixul comportamental.*

Capsula este o structură accesorie, cu o consistenţă gelatinoasă, vâscoasă, care acoperă complet celula bacteriană. În funcţie de gradul de dezvoltare la diferite specii bacteriene, se disting următoarele structuri capsulare:

- *microcapsula*, reprezentată de o peliculă fină de material polizaharidic, în jurul peretelui celular (până la 0,2 μm grosime). La microscopul optic se evidenţiază numai prin metoda imunofluorescenţei, dar este vizibilă la microscopul electronic;
- *macrocapsula*, o structură omogenă, aderentă de celulă, mai groasă de 0,2 μm, vizibilă la microscopul optic prin tehnici speciale de colorare negativă, dacă este o capsulă suficient de compactă şi rigidă, pentru a exclude tuşul de India şi nigrozina. Dacă are o structură laxă şi flexibilă, coloranţii o penetrează. Aderenţa macrocapsulei de celulă este fermă şi prin centrifugare se depune concomitent cu celulele;
- *stratul mucos* este o structură capsulară cu o grosime neuniformă şi distribuţie dezordonată în jurul celulei. Consistenţa este mai fluidă, iar prin centrifugare, celulele se desprind şi se depun, iar materialul polizaharidic rămâne în suspensie;
- *zoogleea* – o masă de material polizaharidic, în care este cuprins un număr mare de celule bacteriene.

Materialul capsular se găseşte la bacteriile Gram pozitive şi Gram negative din sol, ape (dulci şi sărate), rumen, la bacteriile patogene ce produc infecţii ale vezicii urinare şi pulmonare.

Natura chimică a materialului capsular

Materialul capsular este de natură polizaharidică. De cele mai multe ori, în alcătuirea sa se găsesc D-glucoza, D-fructoza, D-galactoza. Mai rare sunt manoza, fucoza, pentozele. Unele polizaharide extracelulare se aseamănă cu acizii teichoici, deoarece conţin glicerol-fosfat sau ribitol-fosfat.

Materialul capsular poate fi un *homopolizaharid* sau un *heteropolizaharid.* Cele mai cunoscute homopolizaharide sunt *dextranii* şi *levanii.*

Dextranii formează o clasă mare de polizaharide, alcătuiţi din unităţi de D-glucopiranozil, legate 1-6, cu punţi de ramificare în poziţiile 2, 3 sau 4. Lungimea lanţului este cuprinsă între 40-500 resturi de glucoză. Dextranii sunt produşi de *Peptococcus (Leuconostoc) mesenteroides*, din sucroză. Sinteza lor este abundentă în melasa de la fabricile de zahăr, unde, o cantitate semnificativă de zahăr este convertită la dextran, aducând prejudicii economice importante.

În stare purificată, dextranul se foloseşte în practica transfuziilor, ca înlocuitor al plasmei, fiind solubil în apă. Sephadexul este un dextran folosit în cromatografia bazată pe principiul sitei moleculare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Levanii sunt poli-D-fructani (fructozizi), sintetizaţi de unele bacterii patogene pentru plante (*Pseudomonas, Xanthomonas),* de *Streptococcus salivarius,* de *Bacillus.* Au greutăţi moleculare de 1000 kD sau mai mult.

Heteropolizaharidele sunt alcătuite dintr-un număr variat de unităţi diferite: glucoză, fructoză, galactoză, manoză, acid galacturonic, derivaţi aminaţi şi acetilaţi ai acestora.

Structura biochimică a heteropolizaharidelor este foarte diferită, nu numai în funcţie de compoziţia chimică globală, ci şi de secvenţa diferiţilor monomeri în catena polizaharidică (de exemplu, pentru xantan, structura repetitivă este un pentazaharid).

Diversitatea monomerilor glucidici conferă heteropolizaharidelor, o anumită diversitate a structurii chimice şi în consecinţă, o anumită specificitate antigenică. De exemplu, la *Streptococcus pneumoniae* există peste 8o de tipuri chimice diferite de material capsular, care corespund nu numai unor diferenţe de compoziţie chimică, dar şi de secvenţă a monomerilor. Varianta antigenică a polizaharidului capsular, imprimă specificitatea anticorpilor în reacţiile de apărare faţă de bacteriile patogene.

Sinteza exopolizaharidelor

Exopolizaharidele se sintetizează prin două mecanisme distincte:

- dextranii se sintetizează *extracelular* într-un proces ce implică enzimele secretate de celula bacteriană. La *L. mesenteroides,* enzimele rămân asociate la nivelul peretelui celular. Sinteza lor este indusă de prezenţa sucrozei în mediul de creştere. Enzima dextran-sucrază clivează molecula de substrat. Jumătatea glicozil este adaugată la acceptor, iar fructoza este utilizată în metabolismul celulei;
- alte exopolizaharide (hetero- sau homopolimeri) se sintetizează *intracelular.*

Biosinteza heteropolizaharidelor are loc în 4 trepte:

a) sinteza intermediarului format din nucleotid-difosfat şi glucid;

b) asamblarea treptată a subunităţii oligozaharidice repetitive a polimerului, prin transferul de la nucleotid la gruparea lipidică purtătoare (C55-undecaprenil-fosfat), localizat în membrana celulară; monozaharidele sunt transferate secvenţial de transferaze specifice;

c) adăugarea grupărilor piruvat, acetat, succinat, hidroxibutirat, sulfat. Astfel se sintetizează unitatea repetitivă a heteropolizaharidelor;

d) transferul catenei polizaharidice repetitive de la purtătorul lipidic, la catena polizaharidică în curs de polimerizare. Polimerul este excretat în mediul extracelular.

Mecanismul polimerizării este puţin cunoscut, dar se presupune că sinteza are loc pe faţa internă a membranei citoplasmatice, după care exopolizaharidul este transferat la suprafaţa celulei prin zonele de aderenţă Bayer, dintre membrana externă şi cea internă.

Sinteza exopolizaharidului necesită *enzime specifice* pentru legarea fiecărui monomer glucidic de nucleotid, *transferaze* pentru legarea fiecărui monozaharid de subunitatea repetitivă, una sau mai multe *polimeraze* pentru legarea subunităţilor repetitive şi proteine implicate eventual în exportul polizaharidului.

Controlul sintezei materialului capsular. Există linii de celule bacteriene necapsulate, dar şi altele care sintetizează materialul capsular indiferent de condiţiile de creştere. Proprietatea de a sintetiza material capsular poate fi pierdută prin mutaţie.

Sinteza polizaharidelor capsulare este *controlată genetic.* La bacteriile care au informaţia genetică codificatoare, sinteza materialului capsular este modulată cantitativ de compoziţia mediului de creştere. De exemplu, dextranii se sintetizează numai dacă *P. mesenteroides* creşte pe mediul cu sucroză. Celulele de *Azotobacter,* cultivate pe un mediu cu azot combinat nu sintetizează material polizaharidic, dar pe un mediu fără compuşi azotaţi, produc un strat mucos abundent, cu caracter adaptativ (stratul mucos limitează difuzia O_2 în celule, protejând astfel nitrogenaza, sensibilă la prezenţa O_2).

La bacteriile enterice, cel mai mare randament al sintezei polizaharidelor se înregistrează în condiţiile unui exces de glucide şi a limitării surselor de N, P, S, în mediul nutritiv. Odată cu creşterea culturii bacteriene care sintetizează polizaharide, mediul nutritiv lichid devine tot mai vâscos, calitate conferită de solubilitatea polimerilor în apă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Unele microorganisme sintetizează continuu exopolizaharide, în timpul fazei de creştere, iar altele, numai în faza logaritmică târzie şi în faza staţionară.

Semnificaţie biologică. Capsula este o structură inertă, accesorie ce nu face parte integrantă din celula bacteriană. Cel mai adesea, nu îndeplineşte o funcţie esenţială pentru celulă.

Bacteriile patogene capsulate sunt virulente, deoarece capsula este un material *chimiotactic negativ* pentru fagocite. Pe mediul solidificat, ele produc colonii *netede* (S, *s*mooth). Mutantele lor necapsulate care produc colonii *rugoase* (R, *r*ough) sunt mult mai puţin virulente.

Materialul capsular este higroscopic (reţine apa) şi astfel protejează celula de efectul dăunător al uscăciunii. Materialul capsular ar putea avea rolul de depozit al unor nutrienţi din mediu.

Glicocalixul comportamental

La anumite bacterii, structurile superficiale sunt acoperite de un *glicocalix* adevărat, constituit dintr-o reţea de filamente polizaharidice şi glicoproteice, legate de lipopolizaharidele membranei externe la bacteriile Gram negative sau de mureina bacteriilor Gram pozitive. Filamentele formează o structură pericelulară dezordonată, ca o pâslă, prin intermediul căreia celula se ancorează fie pe alte celule, fie pe suporturi inerte.

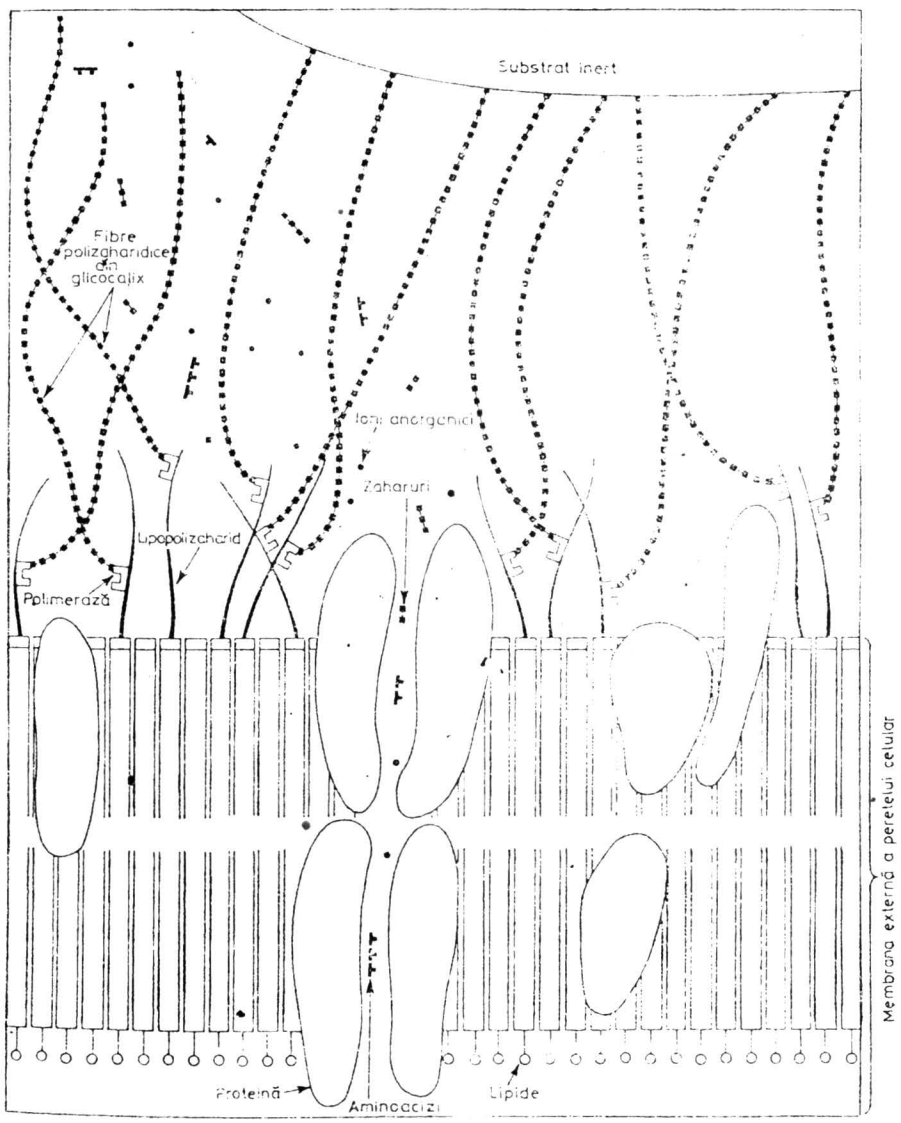


Fig. 33. Reprezentarea schematică a glicocalixului legat de membrana externă a unei bacterii Gram begative (după Costerton, 1978).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Glicocalixul se găseşte numai la bacteriile care trăiesc în mediile naturale, având un caracter *adaptativ*, adică există numai în condiţiile în care prezenţa sa conferă celulei un avantaj selectiv. După cultivare în medii artificiale (bulion, geloză), glicocalixul dispare şi din această cauză, s-a evidenţiat târziu. Deoarece nu persistă la celulele cultivate în mediile artificiale s-a propus denumirea de *glicocalix comportamental.*

Glicocalixul a fost studiat la celulele bacteriene din *placa dentară.* Placa este un depozit de culoare alb-gălbuie, vizibil cu o lupă, ce se formează pe suprafaţa smalţului dentar, iniţiată de *Streptococcus mutans.* Celulele sale sintetizează un polizaharid glucanic, prin intermediul căruia aderă foarte strâns de suprafaţa smalţului, formând iniţial o microcolonie, iar ulterior, o colonie. Celulele aderă între ele, dar şi de smalţul dentar, prin glicocalix. După impregnare cu săruri şi glicoproteine salivare se creează un micromediu anaerob, în care bacteriile elimină produsele de catabolism. Micromediul coloniei se acidifică şi se creează condiţiile favorabile degradării smalţului. Astfel se iniţiază formarea *cariei.*

În mediile naturale, celulele bacteriene lipsite de structura capsulară se ancorează de suport prin intermediul glicocalixului. Legarea celulelor de suport este prima etapă a procesului de colonizare. Astfel se iniţiază formarea coloniei bacteriene.

În mediile naturale, glicocalixul este structura care mediază asocierile bacteriene polispecifice. Astfel s-a demonstrat că în rumen, asocierile coloniale conţin celule ce aparţin unor specii diferite (colonii polibacteriene). Intre ele se stabilesc *relaţii metabolice sinergice,* prin care bacteriile realizează activităţi metabolice, pe care speciile separate nu le pot desfăşura. De exemplu, în rumen se produce CH_4: unele bacterii produc H_2, altele CO_2, iar bacteriile metanogene reduc CO_2, utilzând H_2 ca sursă reducătoare.

Pentru bacteriile *patogene,* glicocalixul este structura prin care celulele se ancorează de celulele mucoaselor şi iniţiază *procesul infecţios.* De exemplu, *Neisseria gonorrhoeae* se leagă de celulele uretrale şi vaginale prin filamentele glicocalixului. Uneori, legarea mediată de glicocalix are caracter de specificitate pentru un anumit tip de celule (de exemplu, bacteriile care iniţiază procese patologice intestinale se leagă uneori exclusiv de epiteliul intestinal).

Glicocalixul capsular şi cel comportamental sunt structuri foarte variabile din punct de vedere fenotipic, având grade foarte diferite de dezvoltare la aceiaşi tulpină bacteriană, în diferite condiţii de mediu. Deşi sinteza lor reprezintă o cheltuială semnificativă de energie, rolul lor funcţional în mediile naturale justifică existenţa structurilor polizaharidice. Glicocalixul dispare la celulele cultivate în medii artificiale. Pe medii nutritive bogate, existenţa acestor structuri nu mai este necesară, dar reapar prin transferul celulelor în medii naturale nefavorabile.

Reunirea tuturor structurilor polizaharidice extraparietale, indiferent de gradul de dezvoltare sub denumirea de glicocalix, a fost propusă de Costerton (1982). Capsula este cea mai importantă dintre ele, ca grad de dezvoltare, dar toate structurile polizaharidice îndeplinesc aceiaşi funcţie esenţială – *aderenţa celulei* de substrat. Gradul diferit de dezvoltare, de la glicocalix la macrocapsulă, implică o diversificare corespunzătoare a funcţiilor acestor structuri.

Prin gradul lor foarte diferit de dezvoltare în raport cu condiţiile de mediu, structurile polizaharidice extraparietale sunt expresia autentică a *plasticităţii fenotipice* structurale a bacteriilor.

Teoria plasticităţii fenotipice consideră că, bacteriile răspund modificărilor mediului de viaţă, prin schimbări structurale şi funcţionale (metabolice) profunde.

Plasticitatea fenotipică a bacteriilor permite *adaptarea rapidă* la schimbări majore ale mediului. Bacteriile sunt primele organisme care se adaptează la condiţiile noi de mediu, în timp ce organismele superioare se adaptează mult mai lent, prin *selecţia mutantelor.*

Bacteriile colonizează ecosistemele noi şi prin mecanismul genetic al *selecţiei mutantelor.* Această dublă capacitate adaptativă – prin plasticitate fenotipică şi prin selecţia mutantelor – explică uriaşul succes al bacteriilor de a popula chiar cele mai ostile medii.

Flagelul

Flagelul (*flagelum* = bici) este organitul extracelular al mobilităţii celulei procariote. Organitul omolog de mobilitate a celulei eucariote este *cilul.* Flagelii se mai numesc şi *undulipode* (*undula* = undă mică; *pus, podos* = picior).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

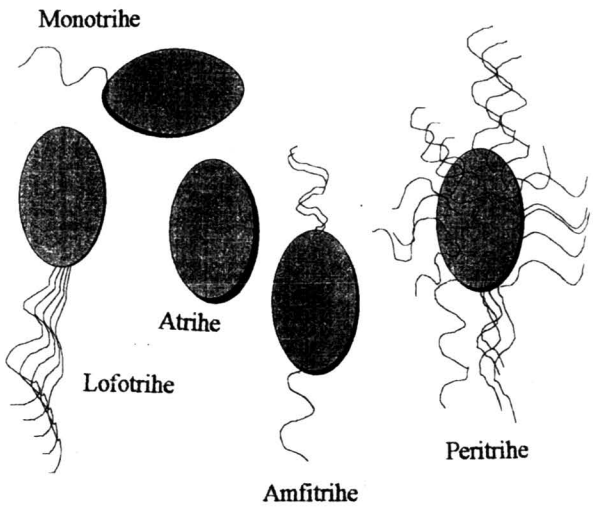


Fig. 34. Reprezentarea schematică a modului de aşezare a flagelilor unei celule bacteriene. Bacteriile fără flageli se numesc atrihe.

Flagelul se prezintă ca un filament extracelular, filiform, ondulat, cu grosimea uniformă pe toată lungimea sa. Lungimea este variabilă, de la 4-5 μm până la 70 μm, iar diametrul este de 20 μm.

Flagelii nu se observă prin examinarea directă a celulelor la microscopul optic. Existenţa lor se deduce indirect, din mobilitatea celulelor bacteriene. Celulele fără flageli se numesc *atrihe*. După numărul şi modul de aşezare a flagelilor, bacteriile sunt:

- monotrihe (cu un singur flagel);
- amfitrihe (cu doi flageli asezaţi la cei doi poli ai unui bacil);
- lofotrihe (au numeroşi flageli aşezaţi grupat, într-un smoc);
- peritrihe (celule cu numeroşi flageli, distribuiţi pe toată circumferinţa celulei).

Poziţia flagelului (sau flagelilor) poate fi polară, subpolară sau ecuatorială.

Structura flagelului

Comparativ cu cilul celulei eucariote, flagelul are o structură simplă. Flagelul îşi are originea în structurile de înveliş ale celulei şi este alcătuit din următoarele elemente:

- corpusculul bazal, localizat în învelişurile celulare;
- cârligul;
- filamentul extern (flagelul propriu-zis).

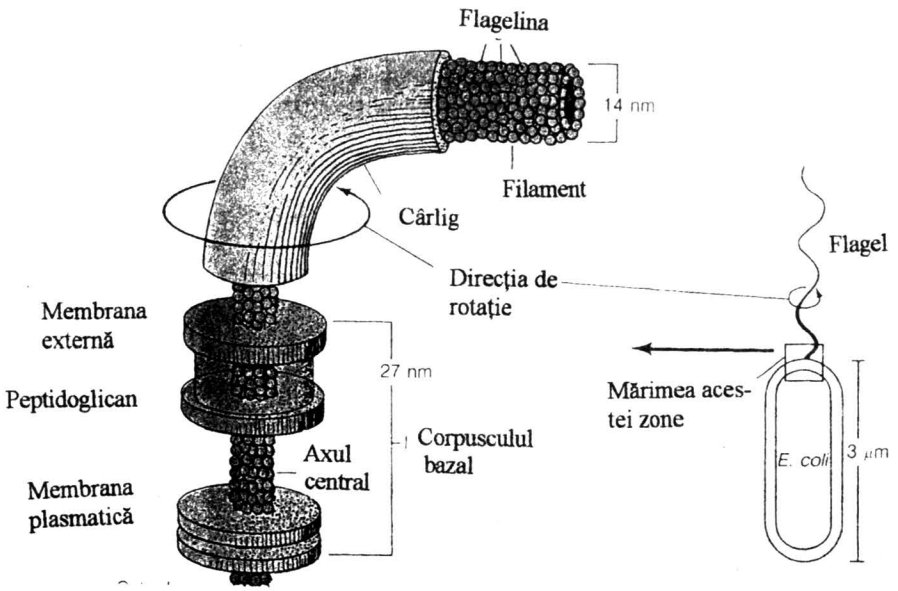


Fig. 35. Reprezentarea schematică a „motorului" rotativ al flagelului de *E. coli*. „Rotorul" este un disc proteic integrat în membrana plasmatică. El se roteşte cu circa 100 revoluţii/secundă, faţă de discul stator, sursa de energie fiind gradientul de protoni.

Corpusculul bazal formează o structură rotativă unică, atât ca alcătuire cât şi ca funcţionalitate în sistemele biologice, asemănătoare, în general, cu un buton de cămaşă. La bacteriile Gram negative, structura sa este mai complexă, deoarece discurile componente sunt duble, alcătuite din proteine diferite şi îndeplinesc funcţii diferite. Se disting următoarele discuri:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- discul (mobil, se rotcşte cu viteză mare) şi este ancorat în structura membranei citoplasmatice;
- discul S (stator) este legat de peptidoglican;
- discul P este ancorat tot în stratul de peptidoglican
- discul L este legat de lipopolizaharidele membranei externe a peretelui.

Cârligul are rolul de articulaţie flexibilă între corpusculul bazal şi filamentul extern. Prin axul său central, cârligul se leagă de corpusculul bazal.

Mişcarea de rotaţie a discului M (3000-4000 r/min) este transmisă cârligului şi filamentului extern.

În alcătuirea flagelului intră cel puţin 11 tipuri de molecule proteice: câte unul în filamentul extern şi cârlig şi cel puţin 9 tipuri de proteine în corpusculul bazal. Cea mai cunoscută este proteina filamentului extern, denumită *flagelină* şi are greutatea moleculară de 40 kD. Moleculele sale sunt aşezate după o simetrie helicală, formând o structură tubulară, canaliculară. Moleculele de flagelină au proprietatea de *autoasamblare*: dacă moleculele de flagelină sunt dispersate, în condiţii adecvate, ele se reasamblează spontan.

Flagelina se sintetizează sub forma monomerilor, în interiorul celulei. Moleculele străbat axul central al structurii bazale şi se aşează după o simetrie helicală pentru a forma filamentul extern. Flagelul bacterian creşte prin regiunea sa apicală.

Cârligul este format din subunităţi proteice identice. Funcţia sa nu este cunoscută.

Corpusculul bazal are o structură moleculară mult mai complexă. Cele 9 proteine diferite sunt organizate în discurile care înconjură un ax subţire, ce se inseră în membrana citoplasmatică.

Energia de rotaţie a structurii bazale este generată de deplasarea protonilor prin membrana celulară.

Motilitatea şi chimiotaxia

Motilitatea bacteriană are două particularităţi: este foarte *rapidă* şi se face după o direcţie *aleatorie*. Motilitatea a fost studiată cu ajutorul unui microscop special (microscop de urmărire), la o mutantă monoflagelară de *E. coli*.

Motilitatea normală a celulei bacteriene este influenţată de prezenţa în mediu, a substanţelor *chimiotactic pozitive* (atractante) sau a substanţelor *chimiotactic negative* (repelente). Substanţele atractante determină deplasarea celulei spre zonele în care concentraţia lor este mai mare. Ele sunt aminoacizi, glucide, ioni de Ca şi Mg, O_2 (pentru cele aerobe) etc. Substanţele repelente au efect chimiotactic negativ asupra celulelor bacteriene, determinând îndepărtarea lor din zonele cu concentraţii mari. Substanţele repelente sunt alcoolii, acizii graşi, O_2 în formă ionică, ionii hidroxil, metalele grele etc.

Într-un mediu neutru (fără atractanţi şi fără repelenţi), celula bacteriană se deplasează după o traiectorie lineară, timp de aproximativ o secundă, apoi se rostogoleşte timp de 0,1 secunde şi reia deplasarea lineară după o direcţie întâmplătoare. S-a încercat să se explice mecanismul alternanţei deplasării lineare şi al rostogolirii. S-a reuşit imobilizarea extremităţii libere a flagelului, cu anticorpi specifici, iar celula a rămas liberă. S-a demonstrat astfel, că motorul rotativ imprimă flagelului două tipuri de rotaţii:

- o mişcare de rotaţie în sens orar
- o mişcare de rotaţie în sens antiorar.

La o celulă peritrihă, când flagelii se rotesc în sens antiorar, ei formează un fascicul coerent, astfel încât imprimă o mişcare de propulsie în linie dreaptă. Când sensul rotaţiei flagelilor devine "orar", celula se dezechilibrează şi se rostogoleşte. Imediat după rostogolire, rotaţia flagelilor devine "antiorară". În condiţii normale de mediu (fără atractanţi şi fără repelenţi), mobilitatea celulei peritrihe este întâmplătoare, în direcţii imprevizibile şi se face printr-o alternanţă de delplasări în linie dreaptă, întrerupte de rostogoliri.

Substanţele chimiotactice modifică modul de deplasare a celulei bacteriene. Când celula se deplasează într-o direcţie favorabilă (în direcţia unui atractant, sau se depărtează de un repelent), deplasarea este preponderent lineară şi rostogolirile sunt mai puţin frecvente, ceea ce semnifică o prelungire a perioadei de rotaţie antiorară şi o scădere a frecvenţei de rotaţie orară a flagelilor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

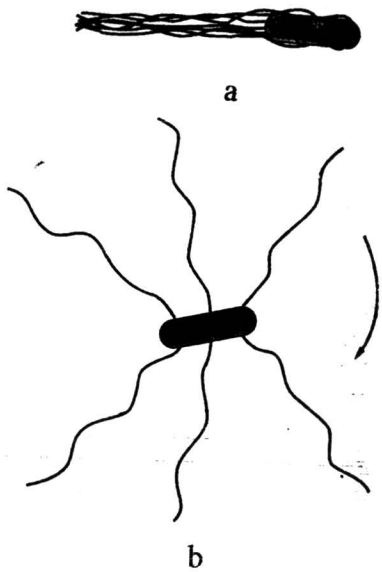


Fig. 36. a. Poziţia flagelilor la *E. coli* în timpul deplasării lineare. Când se rotesc în sens antiorar, se strâng într-un mănunchi şi propulsează celula. b. Când flagelii se rotesc orar, se distribuie uniform şi celula se rostogoleşte.

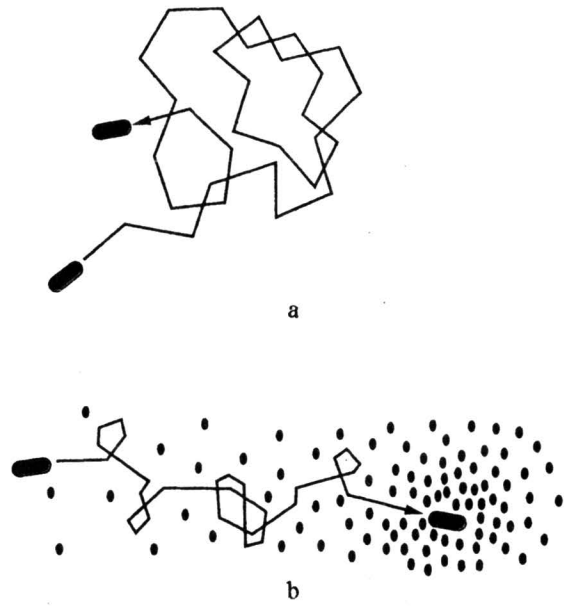


Fig. 37. a. Într-un mediu neutru, deplasarea lineară este întreruptă de rostogoliri, care schimbă întâmplător direcţia de deplasare. b. În prezenţa unui factor chimic atracant, mişcările de rostogolire sunt parţial suprimate. Deplasarea este orientată în direcţia atractantului.

Dacă bacteria se deplasează într-o direcţie nefavorabilă sau într-un mediu neutru creşte frecvenţa rostogolirilor şi scade corespunzător durata deplasărilor lineare. Rostogolirea are rolul de a reorienta celula de la o direcţie greşită. Reglarea frecvenţei răsturnărilor este esenţială pentru chimiotaxie.

Mobilitatea diferenţiată se datorează prezenţei, la suprafaţa celulei, a unor *chemosenzori*. Chemosenzorii sunt structuri moleculare specializate, alcătuite din *chemoreceptor şi proteinele de chimiotaxie*, care au capacitatea de a accepta grupări metilice.

Chemoreceptorul înregistrează prezenţa atractantului sau repelentului în mediu şi transmite informaţiile chimice în celulă. Chemoreceptorii sunt proteine de legare din structura membranei plasmatice şi din spaţiul periplasmic. Extremitatea NH_2 a moleculei este extracelulară şi are rolul de a lega semnalul chimic (atractant sau repelent). Chemoreceptorii au o specificitate relativă faţă de compusul chimic pe care îl leagă. De exemplu, chemoreceptorul pentru galactoză, leagă glucoza şi fucoza, iar cel pentru manoză leagă şi glucoza.

După legarea semnalului chimic, chemoreceptorul catalizează *metilarea proteinelor de chimiotaxie*, din categoria proteinelor transmembranare. Metilarea proteinei de chimiotaxie activează moleculele transductoare, care difuzează spre rotorul flagelar şi comută rotaţia de la un sens la altul.

Gradul de metilare a proteinei de chimiotaxie este dependent de cantitatea de chemoefector din mediu.

În absenţa factorilor atractanţi sau repelenţi, proteinele de chimiotaxie sunt demetilate de proteine citoplasmatice şi producerea factorilor difuzibili este oprită.

Factorul difuzibil nu este cunoscut, dar probabil este o moleculă mică.

Dacă bacteria vine concomitent în contact cu un atractant şi cu un repelent, răspunsul chimiotactic depinde de concentraţia celor doi agenţi şi de afinitatea chemoreceptorilor care îl leagă. Dacă concentraţia repelentului este mai mare, bacteria se îndepărtează, şi invers, dacă atractantul are o concentraţie superioară, celula se deplasează spre zona cu gradient maxim al acestuia.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

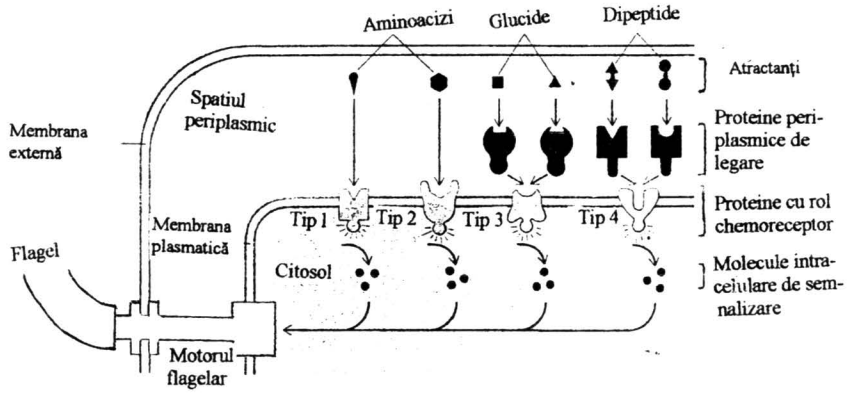


Fig. 38. Mecanismul transducerii semnalului chimiotactic la bacterii. Atractanții chimici se leagă de receptorii de tip 1 sau 2 din membrana plasmatică sau de proteinele periplasmatice, care la rândul lor se leagă de chemoreceptorii de tip 3 sau 4. Receptorii de chimiotaxie se activează și emit un semnal ce determină continuarea rotirii motorului flagelar în sens antiorar. Celula se deplasează preponderent în linie dreaptă, iar rostogolirile sunt parțial supresate (după Alberts și colab., 1994).

Chemosenzorul bacterian este primul care apare în lumea vie, dar este foarte sensibil și exact.

O proprietate definitorie a proteinelor cu rol transductor este *adaptabilitatea* la stimul, ce derivă dintr-un grad semnificativ de memorie a chemosenzorului, deoarece percepe modificările de concentrație a substanțelor chimice, atât în spațiu (de 20 de ori lungimea celulei), cât și în timp și dispune de un sistem de prelucrare a informației care modulează deplasarea celulei într-un mediu cu atractanți și repelenți. Astfel, dacă un atractant este adăugat în mediul de creștere, rostogolirea celulei este suprimată pentru câteva zecimi de secundă. După un timp, frecvența rostogolirilor revine la normal, în prezența continuă a atractantului. Bacteriile rămân în starea de adaptare la atractant, atâta timp cât concentrația acestuia rămâne constantă. Mărirea concentrației atractantului, suprimă din nou mișcările de rostogolire, iar îndepărtarea atractantului mărește frecvența rostogolirilor, până când adaptarea se produce din nou.

Rolul esențial al chemorecepției, este de a modula deplasarea celulei ca răspuns la schimbările concentrației unui component al mediului (și nu de a semnaliza o concentrație constantă a acestuia), orientând deplasarea într-o direcție favorabilă. În suspensie, bacteriile flagelate se află într-o mișcare continuă, după direcții întâmplătoare. Dacă în mediu se creează gradienți ai factorilor fizici sau chimici, celulele se vor deplasa în acea zonă a gradientului, care furnizează condiții optime. Deplasarea este rezultatul unui răspuns tactic (taxie). Cele mai cunoscute taxii sunt:

- fototaxia asigură deplasarea bacteriilor fotosintetizante spre zonele cu luminozitate optimă;
- aerotaxia asigură deplasarea celulelor spre zonele cu concentrație optimă a O_2;
- termotaxia. Temperaturile fiziologice sunt atractante, iar cele prea mari sau prea scăzute, sunt repelente.

Studiile de biomecanică consideră că mobilitatea celulei bacteriene este un caz particular. Viteza de deplasare este foarte mare, de 40-100 de ori lungimea corpului pe secundă, fără echivalent în lumea vie.

Cercetările de reologie au arătat că, datorită structurii flagelului, în mediul nutritiv lichid (bulion), deplasarea celulei bacteriene întâmpină o rezistență foarte mare. Cum se explică o viteză așa de mare, constantă în timp, într-un mediu care opune o rezistență foarte mare? Explicația rezidă în metabolismul foarte intens al celulei bacteriene și în natura particulară a sursei de energie utilizată. Pentru mobilitate, celula bacteriană nu utilizează ATP, ci energia electrochimică, adică fluxul de electroni care străbate regiunea bazală a motorului rotativ. Energia protonică (chemiosmotică) furnizează forța inegalabilă de deplasare a celulei bacteriene.

Semnificația biologică a motilității. Motilitatea favorizează supraviețuirea bacteriilor, oferindu-le posibilitatea să se deplaseze spre zonele din mediu în care condițiile de existență sunt mai favorabile. Bacteriile simbiotice fixatoare de N_2 *(Rhizobium)* se deplasează spre

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

rădăcinile plantelor leguminoase şi iniţiază procesul infecţios. Deşi deplasările însumează 2 centimetri/zi, distanţa este foarte semnificativă.

Pentru bacteriile patogene, mobilitatea (dacă este prezentă) favorizează penetrarea stratului de mucus ce tapetează celulele epiteliale şi facilitează aderenţa bacteriilor, flagelul fiind astfel un factor de virulenţă.

Alte tipuri de mobilitate. Mobilitatea flagelară este avantajoasă numai pentru microorganismele ce trăiesc în mediul aquatic. Multe microorganisme trăiesc în medii cu conţinut scăzut de apă sau în medii care-şi schimbă gradul de umiditate: biofilme, sol etc. Unele bacterii flagelate produc un număr excesiv de flageli laterali, care le permite să se deplaseze într-un strat subţire de fluid pe o suprafaţă solidă. Multe alte procariote se deplasează pe o suprafaţă solidă fie prin alunecare, fie prin mişcări bruşte discontinui.

Mobilitatea prin alunecare se defineşte ca mişcarea unei celule neflagelate în direcţia axului celular lung, pe suprafaţa unor medii solidificate, sau în mediile lichide, la interfaţa aer-apă. Este o mişcare lentă, de târâre, care nu implică un singur mecanism. Mecanismele mobilităţii prin alunecare includ acţiunea unor proteine fibrilare contractile, situate în straturile superficiale ale celulei; propagarea direcţională a undelor de-a lungul suprafeţei celulare; eliminarea orientată a mucilagiului; eliberarea controlată a surfactanţilor la polii celulelor etc.

Celulele de *Proteus*, pe suprafaţa mediului solidificat se deplasează prin *roire* (swarming). Acest tip de mişcare este determinat de apariţia celulelor alungite (filamentoase), cu un număr mare de flageli laterali, denumite *celule roitoare*. Nu se cunoaşte cauza apariţiei acestor celule. Acţiunea unor cataboliţi ar favoriza apariţia lor. După transferul pe mediul proaspăt, roirea continuă. Mişcarea poate fi rezultatul chimiotaxiei negative faţă de cataboliţii care se acumulează, sau al chimiotaxiei pozitive faţă de substanţele nutritive.

La spirochete, mişcarea este rezultatul contracţiei şi relaxării unui *fascicul de fibrile axiale* (axostil), situate între corpul celulei şi o membrană ce acoperă celula. Se produc mişcări pulsatorii prin flexia şi extensia celulei, precum şi o mişcare concomitentă de rotaţie în jurul axului longitudinal.

Fimbriile

Fimbriile sunt structuri de tipul unor apendice filamentoase, drepte şi rigide, mai scurte şi mai subţiri decât flagelii. Sunt alcătuite din molecule proteice identice de *fimbrilină*, cu greutatea moleculară de 16 600 (160 de aminoacizi), aşezate după o simetrie helicală. Numărul lor este de până la 1000/celulă. Dacă sunt numeroase, au o dispoziţie pericelulară. Dacă sunt puţine, au localizare polară sau bipolară. Lungimea lor este foarte variabilă (1-20 μm), ceea ce sugerează că au vârste diferite. Diametrul lor este variabil, fiind cuprins între 3-15 μm.

Structura fimbriilor este tubulară (canaliculară). Fimbrilina este codificată de gene cromosomale, ceea ce denotă că fimbriile au o importanţă ecologică deosebită, prezenţa lor fiind asociată cu anumite condiţii de mediu. După sinteză, fimbrilina este transferată extracelular şi depusă la baza fimbriei.

Fimbriile sunt comune la bacteriile enterice, mai rare la alte bacterii Gram negative şi necunoscute la bacteriile Gram pozitive.

O bacterie posedă câteva tipuri de fimbrii, în funcţie de grosime, lungime, specificitatea antigenică (determinată de secvenţa aminoacizilor în molecula de fimbrilină) şi de specificitatea receptorilor glicoproteici ai celulelor epiteliale de care aderă.

Orice linie bacteriană poate să existe alternativ în varianta fimbriată sau nefimbriată şi să poarte simultan mai multe tipuri de fimbrii. Rata de mutaţie a genelor care codifică sinteza fimbriilor este foarte mare, astfel încât celulele *fim*+ trec în varianta *fim*- şi invers, prin retromutaţie.

Semnificaţia biologică a fimbriilor nu este bine precizată. Ar putea fi structuri adaptative cu rolul de a mări suprafaţa de contact cu mediul înconjurător şi ar fi utilizate ca organite pentru absorbţia nutrienţilor. Cea mai importantă funcţie care li se atribuie ar fi aceea de punţi de ataşare intercelulară sau de suportul inert. La bacteriile din mediile aquatice, fimbriile favorizează asocierile dintre celule şi astfel se formează pelicule fine (filme) de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

neuston la suprafaţa apei, cu rol adaptativ, ce asigură condiţii bune de aerare pentru bacteriile aerobe şi de luminozitate pentru cele fotosintetizante.

La bacteriile patogene, tulpinile fimbriate au un grad superior de virulenţă. Fimbriile aderă ferm de receptorii suprafeţei celulelor epiteliale ale mucoaselor şi ai hematiilor, producând hemaglutinarea. La *E. coli* s-au evidenţiat fimbrii manozo-sensibile (manoza inhibă hemaglutinarea prin competiţia cu receptorii suprafeţei hematiilor).

Fimbriile sunt structuri din categoria *adezinelor,* adică mediază interacţiunea celulă-suport. Cele mai multe adezine fac parte din familia *lectinelor* (glicoproteine cu afinitate înaltă pentru glucidele specifice ale glicoproteinelor celulei gazdă).

Bacteriile patogene şi comensale au o remarcabilă *selectivitate* pentru anumite gazde şi ţesuturi. Tropismul selectiv rezultă din existenţa adezinelor cu diferite specificităţi de legare pentru suprafaţa celulară.

Elaborarea conceptului adezinelor a explicat frecvenţa infecţiilor urinare, diversitatea bacteriilor care le provoacă şi, în special, proprietatea de progresie ascendentă a acestor infecţii, împotriva fluxului urinar. Ascensiunea infecţiei se realizează din aproape în aproape, prin fenomenul de aderenţă.

Pilii

Pilii sunt apendice filamentoase neflagelare, a căror sinteză este codificată de gene localizate în structura unor plasmide denumite *conjugoni sau plasmide de sex.* Celulele purtătoare de pili au capacitatea potenţială de a dona material genetic (sunt celule "mascul"). Numărul pililor pentru o celulă este cuprins între 1 şi 10, iar lungimea este de circa 20 μm. Diametrul extern este de 6-15 nm, iar cel intern de 2,5 nm.

Pilii sunt alcătuiţi din molecule identice de *pilină,* o fosfoglicoproteină de 12-15 kD. Se sintetizează în celulă, de unde este transferată în lumenul piliar şi este asamblată după o simetrie helicală, la extremitatea liberă a acestuia.

Pilii pot fi îndepărtaţi mecanic, prin agitare şi se resintetizează. Prin încălzire sau tratament acid, pilii se dezagregă în moleculele componente (pilina). Restabilirea neutralităţii şi a nivelului termic, permite *autoasamblarea* şi formarea unei structuri identice cu pilul original.

Rolul pililor. Prezenţa pililor este asociată totdeauna cu procesul de *conjugare* bacteriană. Pilii ar putea fi structuri esenţiale de transfer al materialului genetic de la celula donor la celula receptor. Molecula de ADN ar trece prin lumenul pilului.

După alţi autori, pilii ar avea numai rolul de a "agăţa" celula receptoare de material genetic, iar prin retracţia sa ulterioară, cele două celule s-ar apropia.

Rolul pililor în conjugare este argumentat de faptul că depilierea (prin agitare cu perle de sticlă) este însoţită de pierderea capacităţii de conjugare şi de restabilire a ei odată cu resinteza pililor.

Capacitatea de sinteză a pilinei se pierde odată cu pierderea plasmidei de sex şi este redobândită odată cu recâştigarea plasmidei.

Pilii poartă receptori de fagi. Pe suprafaţa pililor se găsesc receptori pentru fagii "ARN masculi". Se numesc fagi "masculi" deoarece infectează numai celulele cu potenţialitate de donor de material genetic. "Marcajul" cu fagii "ARN masculi" este modalitatea de a-i distinge de alte structuri filamentoase. La extremitatea liberă a pililor se găsesc receptori pentru fagii filamentoşi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CREŞTEREA ŞI MULTIPLICAREA BACTERIILOR

Procesele de creştere şi multiplicare a celulei bacteriene sunt consecinţa metabolismului bacterian. Aceste procese au o serie de particularităţi, marcate de intensitatea deosebită a metabolismului şi de reglarea perfectă a acestuia.

Creşterea celulei bacteriene

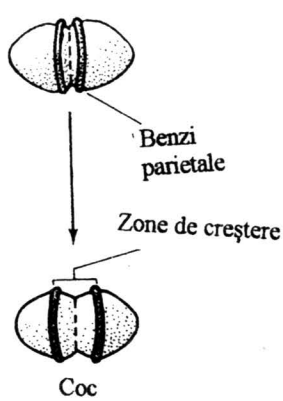
Creşterea – în sens biologic – este rezultatul măririi coordonate a constituienţilor structurali ai unui organism uni- sau pluricelular, ca o consecinţă a sintezelor specifice, echilibrate, pe baza compuşilor nutritivi existenţi în mediu. Pornind de la aceştia, în cursul creşterii se sintetizează noi compuşi, care sunt asamblaţi pentru a forma copii fidele ale constituienţilor celulari proprii.

În mod normal, toţi constituienţii celulari se dublează cantitativ în perioada de creştere, dar afirmaţia este valabilă în primul rând pentru ADN. Creşterea şi multiplicarea bacteriilor sunt procese controlate genetic.

O astfel de definiţie, ce limitează procesul de creştere la ansamblul constituienţilor specifici celulei, elimină din cadrul noţiunii de creştere, mărirea volumului celular consecutivă acumulării unei cantităţi crescute de apă.

Creşterea celulei bacteriene implică *creşterea peretelui celular*. De aceea, studiul mecanismelor de creştere a peretelui celular, reflectă mecanismele de creştere în general. Peretele celular creşte prin secţionarea legăturilor chimice la anumite situsuri caracteristice ale moleculei de mureină şi prin intercalarea unor constituienţi structurali noi.

Forma celulelor bacteriene este consecinţa modului în care are loc creşterea (adăugarea de substanţă nouă). La *bacteriile sferice,* creşterea este localizată într-o bandă îngustă ecuatorială. Dovada a fost adusă de experienţele în care s-au utilizat anticorpi specifici faţă de polimerii parietali, marcaţi cu substanţe fluorescente. Calotele celulei îşi păstrează fluorescenţa câteva generaţii succesive, în timp ce în zona ecuatorială, fluorescenţa dispare progresiv, curând după marcare. Substanţa nouă se depune, în proporţii aproximativ egale, pe toate cele trei direcţii ale spaţiului.



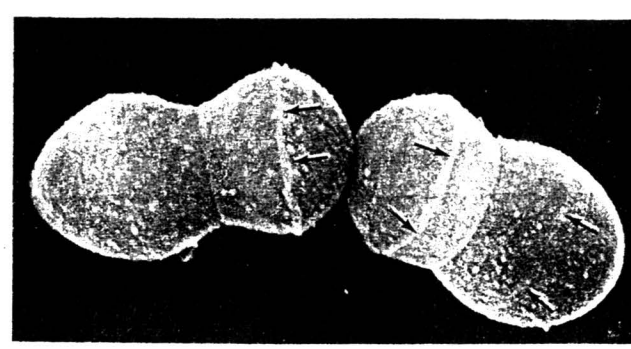


Fig. 39 a. La celulele sferice (coci) sinteza peretelui celular nou este localizată la nivelul zonei ecuatoriale. b. Imaginea electrono-optică în scanning a celulelor de *Streptococcus hemolyticus*. Săgeţile indică zona de iniţiere a septului de diviziune.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Bacteriile cilindrice cresc prin adăugarea substanţei noi, pe direcţia axului lung al celulei.

Depunerea substanţei noi în peretele celular al bacteriilor cilindrice se poate realiza *unipolar, bipolar, ecuatorial* (în zona de formare a septului transversal) sau *intercalar.*

Creşterea celulei bacteriene este limitată în timp, până la atingerea unui volum critic, când încetează şi este urmată de diviziune.

Mecanismul molecular declanşator al diviziunii nu este cunoscut. Un rol important se atribuie *dezechilibrului între suprafaţa şi volumul celulei,* ce apare ca rezultat al creşterii. În mod obişnuit există un raport echilibrat, permanent controlat, între suprafaţa celulei şi volumul ei (S/V).

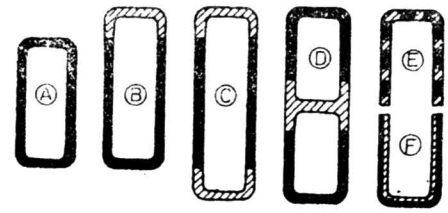


Fig. 40. Reprezentarea schematică a diferitelor modalităţi teoretice de creştere a bacililor, prin adăugarea constituienţilor noi (zona haşurată) la structura parietală. A. Perete celular în faza premergătoare creşterii. B. Creştere limitată la una din extremităţi. C. Creştere la ambele extremităţi. D. Creştere în vecinătatea septului transversal. E. Creştere prin intususcepţiune. F. Creştere prin întinderea peretelui celular şi depunerea de material nou pe suprafaţa internă.

Suprafaţa reprezintă aria celuară prin care se realizează schimburile cu mediul extern. Mărimea suprafeţei condiţionează rata pătrunderii nutrienţilor şi a eliminării substanţelor de catabolism.

Volumul reprezintă masa celulară care consumă nutrienţii şi produce cataboliţii .

În procesul de creştere, suprafaţa se măreşte cu o rată pătrată, iar volumul, cu o rată cubică. Când valoarea raportului S/V atinge o limită inferioară critică, dezechilibrul creat declanşează diviziunea celulară, prin care raportul S/V se reechilibrează.

Multiplicarea bacteriilor se realizează prin *diviziune directă* (simplă), prin *înmugurire* sau prin formarea *sporilor de propagare.*

Multiplicarea prin diviziune

Din punct de vedere structural, mecanismul diviziunii simple şi etapele desfăşurării sale sunt bine cunoscute.

La bacteriile *cilindrice,* diviziunea simplă se face după un plan transversal, perpendicular pe axul lung al celulei. Foarte rar, diviziunea poate avea loc după un plan longitudinal. La *coci,* diviziunea se poate realiza după 1, 2 sau 3 planuri perpendiculare unul pe celălalt, rezultând diplococi, tetrade sau coci aşezaţi în pachete cuboidale.

Nu există un model unic al procesului de diviziune bacteriană. Studiile s-au făcut la un număr limitat de specii bacteriene, aparţinând celor două grupe majore: Gram pozitive şi Gram negative.

Modalitatea predominantă de diviziune a *bacililor Gram pozitivi* este următoarea: în regiunea ecuatorială a celulei se formează un *sept transversal,* alcătuit din membrana citoplasmatică şi peretele celular. Septul creşte progresiv centripet, ca o adevărată diafragmă şi separă cele două celule surori ce vor rezulta din diviziune.

La microscopul electronic se evidenţiază clar etapele succesive ale creşterii centripete a septului ecuatorial. Membrana citoplasmatică, uneori, precede uşor septul parietal, dar niciodată nu progresează pentru a realiza singură, separarea completă a celor doi protoplaşti.

La *bacilii Gram negativi,* diviziunea celulară are loc prin constricţia (strangularea) treptată a celulei la nivelul zonei ecuatoriale. Se produce o creştere treptată a curburii spre interiorul celulei şi o îngustare a ei în regiunea ecuatorială. Constricţia implică, simultan, atât membrana citoplasmatică cât şi peretele celular.

Relaţia dintre celula care se divide şi celulele rezultate din diviziune este, *o celulă mamă – două celule surori.* Celula care se divide dispare. Ea îşi pierde individualitatea în cele două celule întinerite.

De cele mai multe ori, diviziunea este *simetrică sau izomorfă,* adică din procesul de diviziune rezultă două celule de dimensiuni egale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

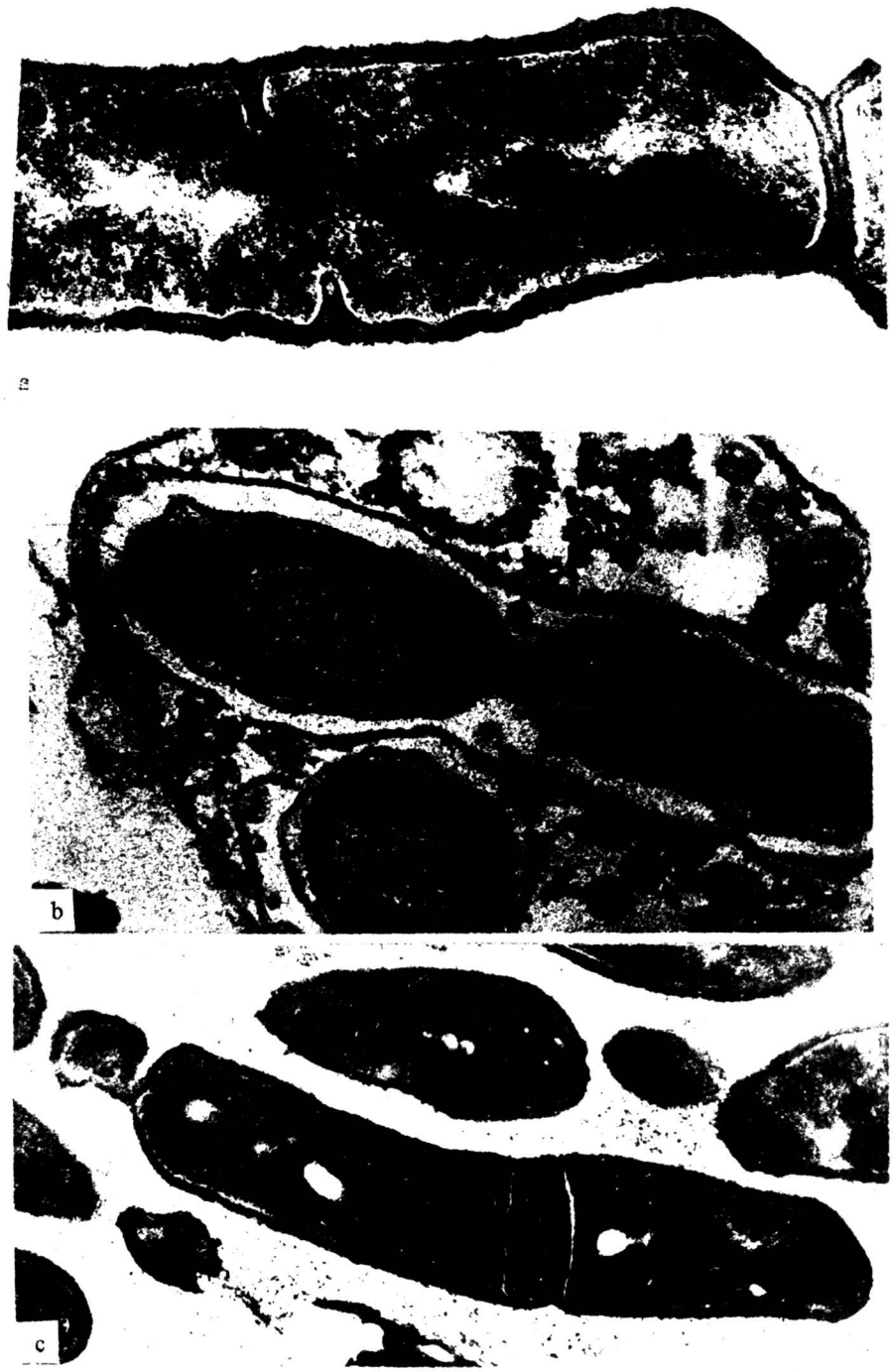


Fig. 41. Imagini electrono-optice în transmisie a celulelor bacteriene în diviziune. a. La *B. subtilis,* diviziunea are loc prin formarea unui sept de diviziune de origine parietală. b. La bacteriile Gram negative, diviziunea se face prin constricţia treptată a celulei la nivelul zonei ecuatoriale. c. Diviziunea asimetrică. La ambele extremităţi ale unei celule de *B. subtilis,* diviziunea inegală generează minicelule (x 56000, 56000 şi respectiv 30000).

Diviziunea asimetrică

Uneori, diviziunea celulară este *asimetrică,* rezultatul fiind formarea a două celule inegale. Cea de dimensiuni mici este o *minicelulă.* Diviziunea asimetrică este caracteristică bacteriilor cilindrice şi se produce frecvent la mutante de *E. coli* şi *B. subtilis.*

Minicelulele (bacterii miniaturale) au fost descrise în 1967 de Adler, ca bacterii foarte mici, care apar la extremitatea celulelor de *E. coli,* după diviziune.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Minicelulele apar foarte rar la bacteriile din mediile naturale, dar sunt frecvente la *liniile mutante*, crescute pe mediile artificiale. În general, minicelulele sunt lipsite de material nuclear, sau conţin o cantitate foarte mică de ADN. Nu pot creşte şi nici nu se divid, dar au activitate metabolică: realizează procese oxidative, produc energie sub formă de ATP.

Adeseori, minicelulele conţin *plasmide*. În cazul în care plasmidele le conferă calitatea de donoare de material genetic, minicelulele pot realiza procese conjugative de transfer de material genetic, unor celule receptoare. Ele pot fi infectate de fagi, dar eliberează un număr mic de fagi progeni.

Iniţial li s-a atribuit numai o importanţă de ordin teoretic, minicelulele fiind structuri ce permit analiza unor procese biologice importante: diviziunea celulară, studiul fenomenelor de transport celular prin membrană. Interesul faţă de ele a crescut, legat de posibilitatea de a le folosi în viitor pentru producerea de *vaccinuri*, chiar în cazul în care provin de la bacterii patogene, deoarece fiind lipsite de capacitatea de diviziune, nu pot iniţia procese infecţioase.

Mecanismul formării minicelulelor nu este elucidat. Una din teoriile care explică diviziunea asimetrică, presupune că în fiecare celulă bacteriană cilindrică există trei situsuri la care se poate iniţia formarea unui perete despărţitor: unul situat central şi celelalte două, distribuite simetric la cei doi poli. În mod normal, bacteriile cilindrice se divid printr-un perete transversal ce se formează la nivelul situsului central. Cele două celule surori moştenesc câte un situs polar. Pe măsură ce cresc, situsul polar dobândeşte o poziţie centrală. Formarea unei minicelule ar fi consecinţa activării premature a unui situs polar, la nivelul căruia se formează un sept de diviziune, înainte ca procesul de creştere celulară să se realizeze complet.

Această teorie nu explică modul de formare concomitentă a minicelulelor "în şiraguri", ceea ce presupune activarea simultană a unui număr egal de situsuri de diviziune.

Formarea minicelulelor pare a fi rezultatul unor mutaţii la nivelul genelor reglatoare ale procesului de diviziune.

Reglarea procesului de diviziune

Diviziunea celulară normală este corelată cu procesul de replicare a cromosomului bacterian. Există un raport temporal strict între replicarea ADN şi diviziunea celulei. Corelaţia este esenţială, deoarece, astfel este prevenită producerea celulelor anucleate. Rata diviziunii celulare este controlată, în primul rând, de rata sintezei ADN.

În celulele care cresc cu o rată normală sau scăzută, sinteza ADN se desfăşoară pe durata a 2/3 din timpul de generaţie. La o tulpină de *E.coli* cu timpul de generaţie de 60 de minute, pentru sinteza ADN sunt necesare 4o de minute. În culturile care cresc mai lent, sinteza ADN durează mai mult, dar necesită tot 2/3 din timpul de generaţie. În astfel de culturi, o celulă tânără rezultată printr-un proces de diviziune, conţine un singur cromosom.

În celulele care cresc pe medii optime, rata de creştere este mare şi diviziunea celulei se face la intervale scurte de timp. *Timpul de generaţie* (intervalul dintre două diviziuni) este mai scurt decât timpul necesar pentru replicarea moleculei de ADN. ADN se replică mai lent decât timpul necesar desfăşurării unui ciclu de diviziune. Celula bacteriană compensează decalajul creat, iniţiind un al II-lea ciclu de replicare a ADN, înainte de

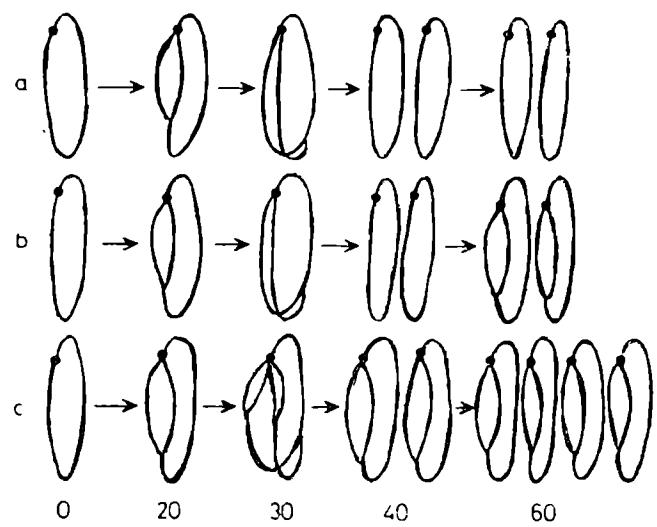


Fig. 42. Replicarea ADN bacterian la diferite rate de creştere. Sunt reprezentate configuraţiile cromosomilor la 0, 20, 30, 40 şi 60 minute, pentru celulele care cresc cu timpul mediu de generaţie de 60 de minute (a), 40 de minute (b) şi de 20 de minute (c).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

încheierea ciclului anterior. Astfel, în celulele care cresc rapid, pe molecula de ADN sunt prezente la un moment dat, câteva puncte de replicare. Numărul lor depinde de rata de creştere a celulei. Când copiile de ADN sunt distribuite în celulele fiice, ele poartă regiuni deja replicate. Ca urmare, informaţia genetică localizată în apropierea situsului de origine a replicării, se găseşte într-un număr mai mare de copii, decât aceea localizată aproape de punctul terminal al replicării cromosomului. Deoarece cantitatea de ADN/unitatea de masă celulară ramâne constantă, celulele care cresc repede sunt mai mari.

La eucariote, sinteza ADN se iniţiază simultan pe toţi cromosomii setului. Pe fiecare cromosom există un număr de situsuri separate, la care sinteza începe simultan.

La bacterii, încheierea replicării cromosomului este semnalul disocierii sale de membrană şi astfel este posibilă repartizarea cromosomilor fii în cele două celule surori. Mcanismul segregării (distribuţiei) celor doi cromosomi nu este cunoscut. Se pare că rolul esenţial în acest proces revine structurilor mezosomale. Clivarea structurii mezosomale este corelată în timp, cu replicarea cromosomului. Fiecare din cei doi cromosomi rămâne legat de câte o structură mezosomală. Creşterea membranei plasmatice în spaţiul dintre cei doi mezosomi, asigură deplasarea acestora spre polii celulei. Fiecare din cele două celule surori va moşteni un cromosom legat de propriul mezosom.

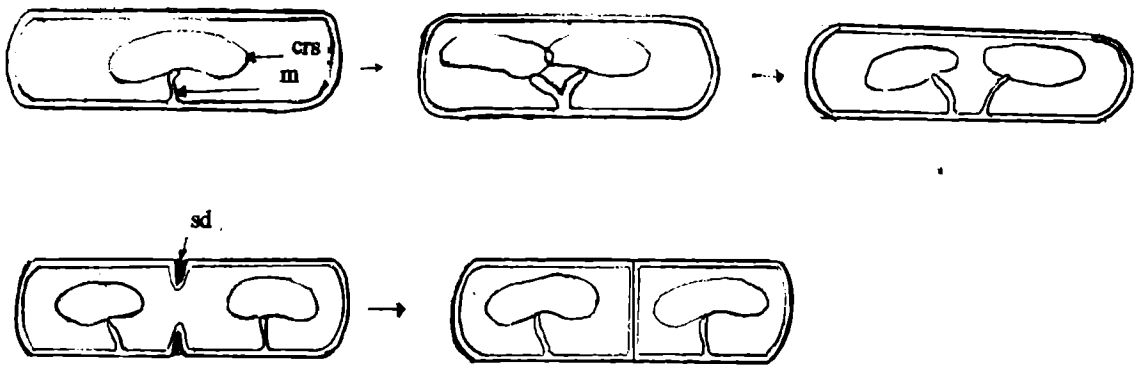


Fig. 43. Ilustrarea schematică a mecanismului segregării cromosomilor în celulele surori rezultate după diviziune (cr = cromosom; m = mezosom; sd = sept de diviziune).

Sinteza ARN. Intr-o celulă care creşte, circa 80% din ARN total este ARN ribosomal, iar restul este reprezentat, în cea mai mare parte de ARNt. ARNm, deşi îndeplineşte funcţia de sinteză a proteinelor reprezintă o proporţie foarte mică a ARN total, deoarece funcţionează pentru câteva cicluri ale sintezei proteice, după care, fiind instabil este degradat.

Spre deosebire de ADN, care se sintetizează într-o perioadă definită a ciclului celular, sinteza ARNr se desfăşoară continuu, pe tot parcursul ciclului de creştere a celulei. La eucariote, sinteza ARN în timpul mitozei este stopată, deoarece, cromosomii fiind condensaţi, transcrierea nu poate avea loc.

Dinamica (evoluţia) unei culturi bacteriene staţionare

Cultura bacteriană este rezultatul creşterii şi multiplicării într-un mediu lichid sau solid, a unei mici cantităţi iniţiale de celule, care constituie *inoculul.*

Microorganismele se cultivă în mai multe scopuri:

- izolarea şi identificarea lor;
- menţinerea viabilităţii lor în colecţie;
- studiul sensibilităţii la antibiotice;
- obţinerea biomasei, a unor produşi de biosinteză sau de fermentaţie.

Există două modalităţi de cultivare a microorganismelor şi tot atâtea tipuri de culturi:

- culturi bacteriene *discotinui,* care se obţin prin cultivarea în mediul nutritiv ce nu se reînoieşte;
- culturi bacteriene *continui,* care se obţin prin cultivarea în mediu lichid reînoit permanent, cu o anumită rată.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În mod curent, în laborator se obţin culturi bacteriene *discontinui*, într-un volum fix de mediu lichid sau solidificat, nereînoit. Odată cu creşterea culturii bacteriene, compoziţia chimică a mediului se modifică: scade cantitatea de substanţe nutritive şi se acumulează cataboliţi, care pot fi toxici.

Într-o cultură discontinuă, numărul de celule viabile variază continuu. Ritmul de diviziune este condiţionat de concentraţia nutrienţilor: este foarte înalt în faza iniţială a evoluţiei culturii, când mediul oferă condiţii optime, dar diminuă treptat, până la 0, pe măsura epuizării nutrienţilor şi a acumulării cataboliţilor.

Cultura discontinuă este *asincronă*. Numai primele cicluri de diviziune celulară sunt sincronizate, dar curând apar decalaje şi ritmul diviziunii devine asincron. Diferite grupe de celule se găsesc în faze diferite ale ciclului de creştere şi multiplicare. Vârsta celulelor unei culturi discontinui este diferită. Numărul de generaţii celulare este limitat.

Analiza evoluţiei unei culturi discontinui se poate face pe o curbă de creştere, trasată în coordonate semilogaritmice. Panta curbei este egală cu valoarea ratei de creştere, variabilă în timp

În raport cu variaţiile ratei de creştere, pe curbă se disting 6 momente:

1) *Faza de latenţă* (de lag sau de creştere 0) este greu de delimitat de faza următoare. Are o durată foarte variabilă: poate să fie foarte scurtă (chiar inexistentă) sau să dureze câteva ore. Numărul celulelor rămâne neschimbat, egal cu cel din inocul sau poate chiar să scadă uşor. Este caracterizată printr-o intensă activitate celulară. În cursul acestei faze, celulele se pregătesc pentru procesele de multiplicare care vor urma.

Timpul de latenţă este lung (1-3 ore) pentru inoculul bacterian care provine dintr-un mediu complex, ce conţine numeroşi compuşi organici, însămânţat într-un mediu sintetic minimal. Latenţa corespunde timpului necesar sintezei enzimelor celulare pentru biosinteza metaboliţilor esenţiali. Latenţa este deasemenea îndelungată, după inocularea unui mediu sintetic minimal, cu un număr mic de celule care provin din acelaşi mediu. În acest caz, bacteriile sunt adaptate fiziologic la mediul de creştere, dar creşterea întârzie, deoarece anumite componente toxice (de exemplu, ionii metalici) nu au fost neutralizate.

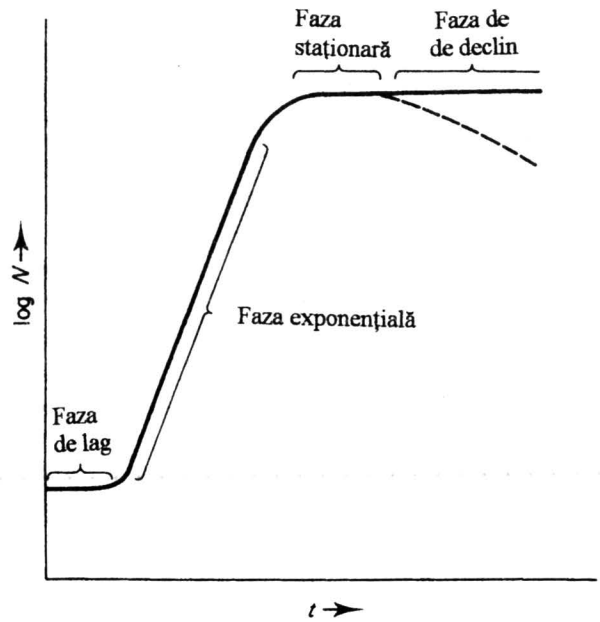


Fig. 44. Curba ideală de creştere a unei culturi staţionare. Linia continuă reprezintă numărul total de celule, iar linia discontinuă ilustrează numărul celulelor viabile.

Timpul de latenţă depinde de starea fiziologică a celulelor din inocul: celulele aflate în faza staţionară se adaptează uşor la un mediu diferit. Dacă inoculul provine dintr-o cultură aflată în faza de declin, alterarea proceselor fiziologice se reflectă în creşterea perioadei de latenţă. Timpul de latenţă nu influenţează durata celorlalte faze de evoluţie a unei culturi.

Uneori, faza de lag, după transferul unei culturi pe un mediu cu compoziţie chimică diferită se poate datora *selecţiei unei populaţii mutante*. În acest caz, marea majoritate a celulelor din inocul, nu pot utiliza sursele de C şi N disponibile, dar în inocul se găseşte o proporţie foarte mică de celule *mutante*, capabile să metabolizeze aceste surse. Din punct de vedere genetic, mutantele sunt diferite de restul celulelor. Din această cauză, perioada de lag este foarte lungă. Masa celulară a culturii va deveni vizibilă numai după ce celulele mutante s-au multiplicat într-o măsură suficientă pentru a constitui o proporţie semnificativă a inoculului. În acest caz, perioada de lag este aparentă şi nu reală, deoarece celulele mutante

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

capabile sa crească, se multiplică exponenţial cu mult înainte ca rezultatul multiplicării să se evidenţieze prin creşterea masei celulare.

Durata perioadei de lag este foarte scurtă sau chiar absentă, dacă inoculul este transferat pe un mediu identic. Celulele posedă deja, echipamentul necesar metabolizării mediului respectiv.

2) *Faza de iniţiere a creşterii* este un interval scurt de timp, în care celulele bacteriene cresc şi se divid cu un ritm care creşte progresiv. Este faza de accelerare a ritmului de creştere.

3) *Faza de creştere exponenţială*. În acest interval, multiplicarea celulelor bacteriene se face cu o rată exponenţială(geometrică)constantă. Ritmul de diviziune este maxim. Mortalitatea celulară este practic nulă. După fiecare diviziune, numărul celulelor se dublează.

Dacă X_0 este numărul de celule/ml la începutul fazei de creştere exponenţială, numărul de celule se dublează succesiv astfel:

- după o diviziune: $X_1 = 2 \times X_o$;
- după două diviziuni: $X_2 = 2^2 \times X_o$
- după *n* diviziuni: $X_n = 2^n \times X_0$.
- Expresia se poate scrie: $\log X_n = \log X_o + n \log 2$.

Creşterea unei culturi bacteriene se realizează într-un interval de timp dependent de *timpul de generaţie* sau timpul de dublare a numărului de celule.

Timpul de generaţie este intervalul necesar pentru ca o celulă tânără rezultată din diviziune, să crească şi să se dividă şi se măsoară în intervalul de timp dintre două diviziuni.

La bacterii, timpul de generaţie se exprimă în minute sau ore: la *E. coli* – 20 min; la *B. subtilis, B. megatherium* – 9-10 min; la *Lactobacillus* – 100 min; la levuri –60-120 min; la parameci – 600 min; la *Amoeba* – 1400 min; la *M. tuberculosis* – 1600 min; la *T. pallidum* – 2000 min.

În culturile aerobe staţionare, numărul maxim de celule care se acumulează în această fază este de 2oo milioane/ml. În condiţii de agitare, contactul cu nutrienţii este favorizat şi se realizează densităţi de 10-20 de ori mai mari.

Pentru o celulă cu timpul de generaţie de 2o de min., după 132 de diviziuni exponenţiale (in mai puţin de 48 de ore) s-ar ajunge la o greutate celulară de 6×10^{27} g, echivalentă cu greutatea planetei. Această capacitate de diviziune ramâne numai potenţială şi se realizează numai pentru intervale foarte scurte de timp, deoarece condiţiile de mediu devin rapid limitante. Multiplicarea foarte rapidă a celulelor bacteriene, este o strategie a supravieţuirii. În condiţii nefavorabile, multiplicarea este nulă.

Durata timpului de generaţie este diferită de la o specie la alta şi este controlată genetic. În funcţie de condiţiile de mediu, timpii de generaţie sunt diferiţi pentru aceiaşi linie bacteriană. La temperaturi scăzute, timpul de generaţie este foarte lung.

În cursul fazei de creştere logaritmică, celulele prezintă câteva particularităţi: sunt uniforme ca mărime şi puţin mai mari faţă de dimensiunile tipice speciei respective. Se colorează omogen, deoarece nu conţin incluzii şi sunt intens bazofile.

4) *Faza de încetinire a creşterii* se caracterizează prin diminuarea pregresivă a ritmului de diviziune. Este o fază scurtă şi la sfârşitul ei, celulele au încetat să se multiplice şi să crească.

5) *Faza staţionară* (sau de creştere maximală) este caracterizată prin faptul că numărul total de celule rămâne constant, celulele nu se mai divid, dar numărul celor viabile diminuă treptat. Celulele unei culturi în faza staţionară, sunt considerate ca tipice pentru specia respectivă: dimensiunile lor sunt normale (mai mici decât cele din faza precedentă), se colorează normal şi pe baza comportamentului lor în coloraţia Gram sunt atribuite grupului Gram pozitive sau Gram negative. În celule, apar substanţe de rezervă, vacuole spori.

Faza staţionară corespunde platoului curbei de creştere. Durata ei este variabilă: în mediile sintetice este scurtă.

Oprirea creşterii este datorată epuizării unui compus nutritiv esenţial, denumit *limitant* al creşterii. Dacă componentele minerale ale mediului sunt în exces, compusul limitant este de obicei energetic. În cazul bacteriilor auxotrofe, în prezenţa componentelor minerale şi energetice, oprirea creşterii se datorează epuizării unui factor de creştere.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

6) *Faza de declin* a culturii este ilustrată grafic de panta descendentă a curbei. Masa celulară scade progresiv. Cu o rată similară, scade numărul celulelor viabile. Cele care nu sporulează, mor şi se lizează. Morfologia celulelor este alterată şi apar forme atipice: sferice, filamentoase, ramificate. Celulele conţin substanţe de rezervă, vacuole. Afinitatea pentru coloranţii bazici diminuă treptat, odată cu scăderea cantităţii de ARN. Sunt celule îmbătrânite. Numărul lor diminuă treptat, iar pentru speciile nesporulate tinde repede spre 0 şi cultura se sterilizează.

Creşterea colonială. Bacteriile diseminate pe suprafaţa sau în masa unui mediu nutritiv agarizat se divid şi prin multiplicarea fiecărei celule sau a fiecărei grupări elementare, se formează o *colonie bacteriană*. Fiecare colonie, izolată spaţial de vecinele sale, constituie o clonă celulară. Numărul celulelor într-o colonie depinde de talia celulelor şi de viteza lor de creştere. Numai celulele situate la periferia coloniei, în contact cu mediul nutritiv, sunt metabolic active.

Dacă după fiecare diviziune, cele două celule surori se separă complet, colonia va lua o formă regulată: sferică sau de lentilă biconvexă, pentru cea inclusă în grosimea gelozei şi o formă bombată, netedă, pentru cea de pe suprafaţa agarului. Acestea sunt *colonii S(*Smooth).

Dacă celulele surori aderă unele de altele, aspectul coloniei devine neregulat, cu suprafaţa încreţită, rugoasă, proprie *coloniei de tip R* (*R*ough).

Culturi continui

Bacteriile prelevate în faza exponenţială şi transferate pe un mediu identic se divid fără faza de latenţă. Această observaţie a stat la baza realizării sistemelor de *cultură continuă*, în care bacteriile se multiplică cu o viteză constantă, într-un mediu reînoit cu o rată constantă.

Culturile continui se realizează în *chemostat* sau în *turbidostat*.

Funcţionarea *chemostatului* se bazează pe principiul diluţiei continue a suspensiei de celule, la un volum constant. Mediul proaspăt de creştere este adăugat cu o rată constantă în recipientul de cultivare. Cu aceiaşi rată, suspensia celulară este recoltată printr-un sifon de "supraplin", astfel încât volumul de mediu din recipient rămâne constant. Compoziţia mediului nutritiv din chemostat nu este ideală, dar se păstrează constantă şi condiţionează rata de creştere a microorganismelor, care nu este maximală. Chemostatul permite controlul densităţii celulelor şi a ratei de creştere a culturii, în funcţie de rata reînoirii mediului, precum şi modelarea creşterii microorganismelor în mediile naturale.

Turbidostatul se bazează pe principiul menţinerii constante a densităţii celulare (turbidităţii) în mediul nutritiv, înregistrată permanent de o celulă fotoelectrică. Când densitatea celulară creşte, celula fotoelectrică emite un semnal, rezultatul fiind deschiderea unei valve prin care mediul proaspăt este trimis în recipientul de creştere. De aici, suspensia este recoltată prin mecanismul de "preaplin".

Densitatea optică a suspensiei este cu atât mai mare, cu cât lungimea de undă a luminii este mai mică. Pentru a evidenţia absorbţia, măsurarea se face cu o sursă de lumină, cu lungimea de undă mai mare de 490 nm.

Culturi sincrone. Culturile bacteriene sincrone sunt discontinui, dar pentru câteva generaţii de celule, se creează artificial condiţiile diviziunii sincrone.

După transferul unui inocul în mediul nutritiv, pentru câteva generaţii celulare (4-6),

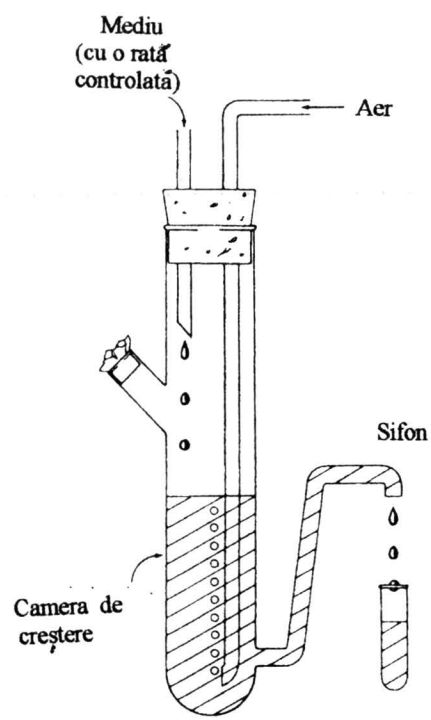


Fig. 45. Reprezentarea schematică a unui chemostat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

creşterea şi diviziunea sunt sincronizate pentru toate celulele populaţiei. Din această cauză, numărul celulelor culturii creşte brusc, prin paliere succesive. Fiecare palier semnifică dublarea numărului de celule. Curând însă, se manifestă un decalaj evident al ratei de creştere şi diviziune. După 4-6 diviziuni, palierele se atenuează şi creşterea numărului de celule se face după o linie dreaptă.

Sincronizarea creşterii şi diviziunii celulelor unei populaţii, se obţine experimental prin două tipuri de metode: *biochimice* (prin blocarea biosintezelor celulare, consecutivă acţiunii factorilor chimici sau fizici, de exemplu, şocul termic) şi *biofizice* (prin separarea celulelor după dimensiuni).

Separarea celulelor după dimensiuni se realizează prin *centrifugare* în gradienţi, cu condiţia ca substanţele în care se face gradientul (sucroză, dextran) să nu fie metabolizate de celulele supuse tehnicii de separare.

Separarea celulelor prin *filtrare* pe un suport adecvat (hârtie, celuloză) permite trecerea celulelor mici. În mediu nutritiv, ele se divid sincron, ceea ce denotă caracterul lor fiziologic uniform.

Creşterea diauxică

În mediile nutritive care conţin două surse glucidice se observă două tipuri de creştere:

- uneori, curba de creştere este similară celei clasice, obţinută cu o singură sursă glucidică;
- alteori, curba de creştere are o denivelare. Faza exponenţială observată în prima parte, este urmată de un platou şi apoi o a II-a fază exponentială, care debutează după perioada de latenţă a platoului intermediar. Fenomenul a fost descris de J. Monod, (1942) la *E. coli*, crescută pe un mediu care conţine glucoză şi galactoză.

Creşterea culturii are loc în două faze exponenţiale distincte: una corespunzătoare creşterii pe glucoză, iar cea de a II-a, corespunzătoare creşterii pe galactoză. În prima fază este utilizată glucoza. Urmează o perioadă de lag de circa 4 ore şi apoi a doua fază de creştere, în cursul căreia celulele metabolizează galactoza.

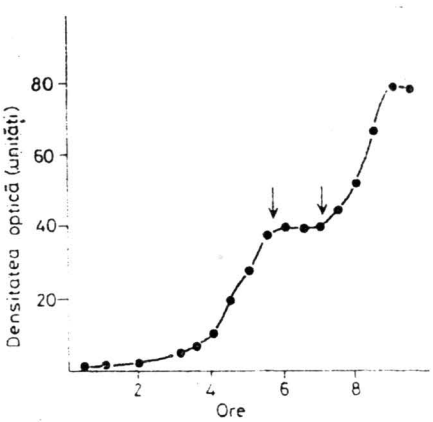


Fig. 46. Creşterea diauxică a culturii de *B. subtilis* pe mediu cu glucoză şi arabinoză. Glucoza este utilizată în prima perioadă de creştere şi arabinoză în cea de-a doua. Încetarea temporară a creşterii după circa 5 ore (marcată între două săgeţi) reflectă utilizarea completă a glucozei şi corespunde perioadei în care are loc sinteza enzimelor necesare pentru utilizarea arabinozei (după Monod, 1958).

Fenomenul diauxiei apare numai pentru zaharuri metabolizabile de către *enzimele inductibile*, şi nu se manifestă când mediul conţine un amestec de zaharuri metabolizabile sub acţiunea enzimelor *constitutive*.

Perioada de latenţă care urmează primei creşteri logaritmice corespunde timpului necesar sintezei enzimelor inductibile.

Cea mai netă creştere diauxică este dată de amestecul de glucoză sau manitol (grupul A), cu arabinoză, xiloză, sorbitol, maltoză sau lactoză (grupul B). Substraturile de tip A inhibă sinteza enzimelor inductibile ce catabolizează substraturile din grupul B (fenomenul represiei catabolice).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL III

NUTRIŢIA BACTERIANĂ

Pentru creştere sau supravieţuire, bacteriile trebuie sa găsească în mediul ambiant, substanţe nutritive cu rol *energetic*, cu rol *structural* şi uneori, *nutrienţi specifici (factori de creştere)*, cu rol funcţional esenţial. Nutrienţii trebuie să se găsească în concentraţii adecvate, deoarece concentraţiile mari exercită efecte toxice. Unele substanţe au numai rol energetic, iar altele au atât rol structural cât şi energetic.

Substanţele energetice sunt oxidate în metabolismul celular şi eliberează energia. Ele pot fi minerale sau organice şi au rolul de donatori de electroni sau de H, în cursul reacţiilor catabolice. Cunoaşterea exigenţelor nutritive ale diferitelor bacterii este importantă pentru clasificarea bazată pe natura sursei energetice, pentru prepararea mediilor selective (cele care conţin o singură sursă energetică, utilizată de unul sau de câteva tipuri de bacterii). De exemplu, un mediu sintetic care conţine numai triptofanul ca sursă de carbon şi energie permite creşterea numai a celulelor de *E. coli*.

În funcţie de proporţia în care substanţele nutritive sunt necesare, se disting două grupe: *macronutrienţi şi micronutrienţi*.

Categoria substanţelor *macronutritive*, cu rol structural şi funcţional cuprinde:

- *sursa de azot*, sub forma NH_3 sau a *sărurilor de amoniu* în soluţie, pe care le asimilează majoritatea bacteriilor. Puţine folosesc *nitratul sau nitritul sau un compus azotat organic* (aminoacizi, amine);
- *sursa de carbon*. Pentru majoritatea bacteriilor, sursa de carbon asimilabilă este un substrat organic. Un număr restrâns de specii utilizează CO_2 ca sursă de carbon asimilabil. Compuşii organici cu carbon au rol dublu, fiind în acelaşi timp utilizaţi ca substrat energetic oxidabil dar şi ca sursă de carbon asimilabil, o parte fiind degradată pentru a produce energie, iar o altă parte este asimilată pentru biosinteze;
- *ionii minerali* cei mai importanţi sunt: fosfatul, sulfatul, clorul, potasiul, sodiul, magneziul. Unii compuşi anorganici sunt *oligoelemente*, necesare în concentraţii foarte mici (Mn, Fe, Co) şi sunt aduse în mediu odată cu impurităţile altor compuşi minerali. Ionii minerali intră în alcătuirea unor enzime sau a unor molecule cu rol de coenzime.

Fosforul, sub forma fosfaţilor, este folosit pentru sinteza acizilor nucleici şi a fosfolipidelor. Majoritatea microorganismelor utilizează fosfatul anorganic (PO_4^{2-}), iar fosfaţii organici, deşi apar frecvent în natură, sunt utilizaţi numai după acţiunea fosfatazelor, care eliberează fosfatul anorganic.

Sulful are rol structural, fiind component al unor aminoacizi (cisteina, metionina) şi a unor vitamine (tiamina, biotina, acidul lipoic). Sulful este preluat sub formă de sulfat sau sulfid(S^{2-}).

Potasiul are rol în activarea unor enzime, chiar a celor implicate în sinteza proteică.

Magneziul stabilizează ribosomii, acizii nucleici şi este necesar pentru activitatea multor enzime, inclusiv a fosfotransferazelor.

Calciul are rol în stabilizarea peretelui celular bacterian şi este un component esenţial al endosporului bacterian.

Sodiul este necesar pentru creşterea bacteriilor halofile, în concentraţii apropiate de limita solubilităţii NaCl în apă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fierul se găseşte în enzimele celulare cu rol în respiraţie (citocromi).

Unele sunt *oligoelemente*, necesare în concentraţii foarte mici(Cu, Ni, Se, Mo, Mn, Fe, Co) şi sunt aduse odată cu impurităţile altor compuşi minerali. Ionii minerali intră în alcătuirea unor enzime sau a unor molecule cu rol de coenzime.

Cobaltul este necesar numai pentru sinteza vitaminei B_{12}. Dacă vitamina se adaugă în mediu, Co nu mai este necesar.

Zincul are rol structural în molecula unor enzime: anhidraza carbonică, alcool-dehidrogenaza, ARN- şi ADN-polimeraza.

Molibdenul se găseşte în enzimele denumite *molibdoproteine*, cu rol în reducerea asimilatorie a nitratului. Se găseşte în *nitrogenază*, enzima care catalizează reducerea N_2, în procesul fixării biologice.

Cuprul intră în alcătuirea unor enzime respiratorii.

Manganul este activator al unor enzime ce acţionează asupra compuşilor ce conţin fosfat. Se găseşte în unele enzime SOD (enzime ce detoxifică formele toxice ale O_2).

Nichelul intră în alcătuirea hidrogenazelor, cu rol de producere sau de înglobare a H_2.

Tungstenul (Wolframul) şi *seleniul* sunt necesare bacteriilor care clivează formiatul. Seleniul este parte a enzimei formiat-dehidrogenază.

Apa reprezintă 80-90% din greutatea unor bacterii şi este o componentă obligatorie a mediului nutritiv.

Tipuri de nutriţie a microorganismelor

Tipurile trofice sau de nutriţie a bacteriilor sunt condiţionate direct de capacităţile lor de biosinteză. La rândul lor, activităţile biosintetice sunt expresia complexităţii aparatului enzimatic celular.

Pentru a defini tipul de nutriţie a unui microorganism trebuie luate în consideraţie mai multe criterii:

- capacitatea de a face biosinteza metaboliţilor esenţiali;
- sursa dominantă de energie utilizată în procesele de biosinteză;
- natura substratului folosit ca sursă reducătoare.

După *capacitatea de a face biosinteza* metaboliţilor esenţiali, bacteriile pot fi:

- autotrofe
- heterotrofe

Microorganismele *autotrofe* folosesc CO_2 ca unică sau principală sursă de carbon celular, iar cele *heterotrofe* folosesc substanţele organice, atât ca sursă de carbon pentru biosinteze, cât şi ca sursă de energie.

Marea varietate a tipurilor nutriţionale întâlnite la microorganisme, nu poate fi exprimată numai în funcţie de natura sursei de carbon, fapt care a impus utilizarea unor noi criterii.

În funcţie de sursa *dominantă de energie*, bacteriile se pot grupa în două categorii:

- microorganisme *fototrofe (fotosintetizante)*, cele care utilizează energia fotonică (luminoasă), pe care o convertesc în energie chimică, sub forma legăturilor macroergice din ATP;
- microorganisme *chemotrofe (chemosintetizante)*, cele care îşi obţin energia prin reacţii de oxido-reducere a substratului chimic organic sau anorganic.

În funcţie de *natura substratului folosit ca sursă reducătoare* (donator de H^+ sau de electroni), microorganismele chemotrofe prezintă două tipuri de metabolism energetic:

- unele sunt microorganisme *litotrofe* (*litos*, grec = piatră), adică utilizează ca donori de electroni, diferite substanţe anorganice (H_2, H_2S, S°, $S_2O_3^{2-}$ (tiosulfat), Fe^{2+}, NO_2, NH_3), pe care le oxidează (la apă, sulfat, Fe^{3+} şi respectiv NO_3), în reacţii exergonice cuplate cu sinteza ATP;
- altele sunt *organotrofe*, deoarece, ca donori de electroni, folosesc diferiţi compuşi organici.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În funcţie de natura *sursei de carbon, a sursei de energie şi a substratului donor de potenţial reducător* (H sau electroni) se disting următoarele tipuri de nutriţie:

- *nutriţia fotolitotrofă*; sursa de carbon este CO_2, cea de energie este radiaţia luminoasă, iar donorul de H este un compus anorganic (H_2O, H_2S, sulful elementar, H_2). Această modalitate de nutriţie este caracteristică bacteriilor fotosintetizante din familiile *Chromatiaceae, Chlorobiaceae*, dar şi pentru grupul *Cyanobacteria*, care fac fotosinteza după mecanismul molecular al fotosintezei plantelor superioare;
- *nutriţie fotoorganotrofă*; sursa de carbon este un compus organic, care are rol şi de donor de potenţial reducător (H), iar sursa de energie este radiaţia luminoasă. Acest tip de nutriţie este caracteristic bacteriilor din familia *Rhodospirillaceae*.
- *nutriţie chimiolitotrofă*; sursa predominantă de carbon este CO_2. Potenţialul reducător este furnizat prin reacţiile de oxidare a unor *compuşi anorganici* (NH_3, NO_2, H_2S, S elementar, Fe^{2+}, H_2), care au rolul de donori de protoni (ioni de H). Nutriţia chimiolitotrofă este caracteristică exclusiv unor grupe de bacterii: nitratbacterii, nitritbacterii, ferobacterii, bacteriile acetogene şi metanogene sau cele care oxidează CO;
- *nutriţia chimioorganotrofă*; sursa de carbon o constituie compuşii organici, care au şi rol de donor de potenţial reducător. Prin oxidarea lor, se eliberează energia necesară proceselor de biosinteză. Majoritatea bacteriilor sunt chimioorganotrofe: *Bacillus, Clostridium, Pseudomonas, Lactobacillus*, precum şi toate bacteriile patogene sau potenţial patogene.

Nutriţia autotrofă

Microorganismele autotrofe (fotolitotrofe şi chimiolitotrofe) au capacităţi mari de biosinteză. Ele sintetizează toţi metaboliţii necesari, pornind de la surse anorganice de carbon şi azot.

Microorganismele autotrofe utilizează CO_2 ca unică sau principală sursă de carbon, pe care îl reduc la aldehidă 3-fosfoglicerică. Sursele de azot sunt compuşi simpli: NH_4, NO_2 sau chiar N_2 molecular.

Energia necesară reducerii CO_2 la compuşi organici, este eliberată prin oxidarea unor compuşi anorganici: CO, NH_3, NO_2, Fe^{2+}, H_2S, S°, $S_2O_3^{2-}$, H_2 sau energia luminoasă. Energia eliberată prin oxidarea compuşilor chimici anorganici sau cea luminoasă este stocată în ATP şi utilizată pentru reacţiile de reducere.

Autotrofia nu se referă la natura sursei de energie folosită, ci la natura sursei de carbon. Pentru organismele autotrofe, este definitorie capacitatea de a face sinteza materiei organice din substanţe anorganice.

Toate microorganismele presupuse anterior a fi strict (obligat) autotrofe sunt de fapt *autotrofe facultative*, deoarece se pot dezvolta şi *heterotrof*, prin metabolizarea unor compuşi organici adăugaţi în mediu (de exemplu, acetatul). Hidrogen-bacteriile utilizează ca potenţial reducător (donori de protoni), glucidele şi acizii organici, în funcţie de condiţiile de mediu.

Faptul că microorganismele autotrofe sunt facultativ heterotrofe, are o semnificaţie secundară. Esenţială rămâne capacitatea lor de nutriţie autotrofă, ce constă în încorporarea CO_2 în compuşi organici, proces denumit *fixarea* CO_2.

Nutriţia fotolitrofă. Fotosinteza

Fotosinteza este procesul biologic de transformare a energiei luminoase, în energie de legătură chimică, utilizabilă în reacţiile de biosinteză. Organismele fotosintetizante datorează această capacitate, prezenţei unor pigmenţi sensibili la lumină, denumiţi *clorofile*.

Majoritatea organismelor fotosintetizante sunt *autotrofe*, capabile să utilizeze CO_2 ca singură sursă de carbon.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Energia luminoasă este convertită într-o serie de reacţii, în energie chimică sub forma *ATP* şi a potenţialului reducător sub forma *NADPH*. Cele două tipuri de molecule, într-o succesiune de reacţii, convertesc CO_2 la glucoză, după următoarea reacţie globală:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O + \text{E luminoasă} \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

Fotosinteza este rezultatul a două tipuri de reacţii: *reacţii fotochimice la lumină* şi *reacţii la întuneric.*

Reacţiile la lumină. Clorofila absoarbe energia luminoasă şi o converteşte în energie chimică, sub formă de ATP şi de NADPH, ca potenţial reducător al CO_2. Molecula de clorofilă excitată şi energizată după absorbţia cuantei de lumină, eliberează un electron (e), care este acceptat indirect de *feredoxină sau de bacteriofeofitină* (o bacterioclorofilă *a*, căreia îi lipseşte magneziul), ambele puternic reducătoare, cu potenţial redox scăzut. Transferul de electroni de la clorofilă, la unul din reducători constituie treapta conversiei luminoase în energie chimică.

Sarcina pozitivă a moleculei de clorofilă oxidată (dupa pierderea unui electron) este neutralizată de un alt electron, originar dintr-un citocrom situat spe cealaltă faţă a membranei. Astfel, între citocromul oxidat şi feredoxina redusă, se creează o mare diferenţă de potenţial electrochimic, a cărui energie poate fi utilizată în două moduri:

- pentru a converti ADP la ATP, prin intermediul transportorilor de electroni;
- pentru a transfera electronii de la feredoxina redusă la NADP şi reducerea sa la NADPH, utilizabil în reacţiile de biosinteză.

În reacţiile *la întuneric*, energia stocată în ATP şi NADPH este utilizată pentru a converti CO_2 şi H^+ în glucoză şi apă:

$$2\ NADPH + 2\,H^+ + CO_2 \rightarrow (CH_2O)_6 + 2\,NADP^+ + H_2O$$

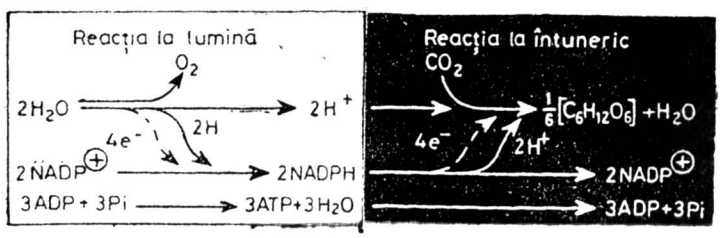


Fig. 47. Reprezentarea schematică a reacţiilor la lumină şi la întuneric, ale fotosintezei.

În procesul de fotosinteză a plantelor superioare şi a cianobacteriilor, electronul pierdut de molecula de clorofilă, este recuperat pe seama oxidării apei;

$$2\ H_2O \rightarrow O_2 + 4\,H^+ + 4\,e^-$$

Rezultatul net al fotosintezei oxigenice este transferul ionilor de H^+ din molecula apei, la CO_2, printr-un proces de oxido-reducere în care apa este oxidată, iar CO_2 este redus.

Potenţialul redox al apei este +0,81 V, net pozitiv faţă de –0,42 V al acceptorului intermediar necunoscut. De aceea, transferul de electroni nu se poate face direct între H_2O şi CO_2. H_2O nu poate reduce CO_2, dar nici nu poate fi oxidată de CO_2.

Energia furnizată de o singură cuantă de lumină nu este suficientă acestui proces. Este necesară energia furnizată de două cuante, prin excitarea a doi centri de reacţie la lumină. Cei doi centri de reacţie ai clorofilei fotoactivate sunt legaţi în serie ca o pereche de baterii electrice şi formează *fotosistemele I şi II.* Ei absorb radiaţii luminoase cu lungimi de undă uşor diferite. Fotosistemul I al clorofilei, denumit P_{700}, absoarbe radiaţiile din domeniul roşu îndepărtat, iar fotosistemul II, notat cu P_{680}, absoarbe radiaţiile cu lungime de undă mai scurtă. Ambele fotosisteme sunt variante ale *clorofilei a* .

Fotosistemul I realizează un *transport ciclic* al electronilor, în cursul căruia se sintetizează ATP şi se generează NADPH (fotofosforilare ciclică). Circuitul electronilor este ciclic, adică se reîntorc pe molecula clorofiliană de origine, după ce au parcurs un traseu format din cupluri redox.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acceptorul primar de electroni al fotosistemului I, nu a fost identificat. Ar putea fi un radical liber al clorofilei *a*. Acceptorul primar devine un reducător suficient de puternic pentru a reduce *feredoxina*, care la rândul ei reduce $NADP^+$ la NADPH.

Fotosistemul II are ca funcţie principală, *fotoliza apei* şi participă la procesul de *fotofosforilare neciclică*. Electronii neciclici pierduţi de molecula de clorofilă, sunt înlocuiţi cu electronii din ionii OH^-, rezultaţi prin fotoliza apei. Molecula de clorofilă P_{680}, excitată de o cuantă de lumină, reduce un intermediar necunoscut (probabil feofitina *a* – o clorofilă *a* fără atomul de Mg). Electronii nu se mai întorc pe molecula de origine a fotosistemului II, ci intră în circuitul fotosistemului I.

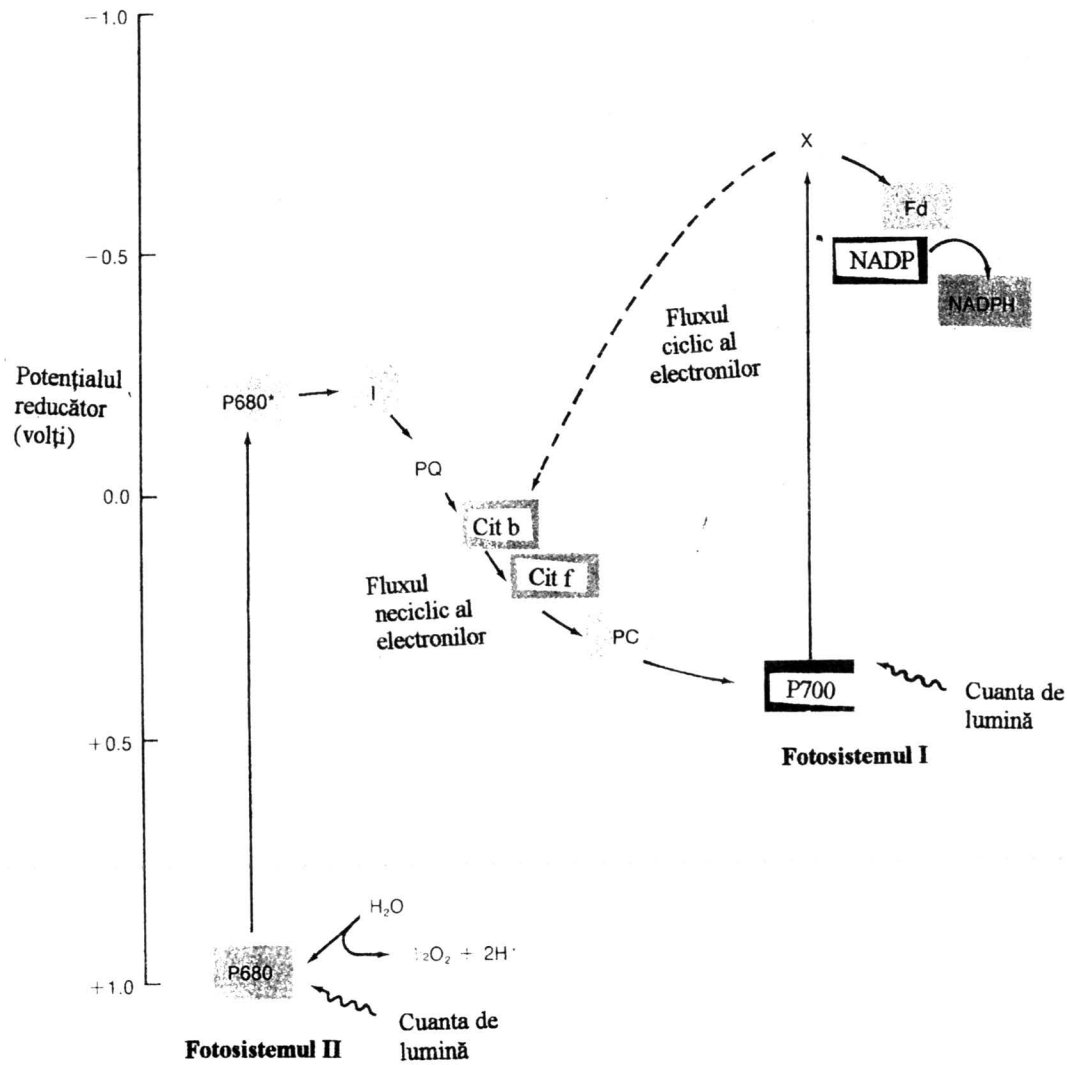


Fig. 48. Schema „Z" a fluxului de electroni în fotosinteza oxigenică a plantelor, algelor şi a cianobacteriilor. Cele două fotosisteme (I şi II) sunt legate în serie. I = acceptorul intermediar neidentificat al fotosistemului II; PQ = plastoquinona; Cit = citocrom; PC = plastocianina; X = acceptorul neidentificat, al electronilor în fotosistemul I; Fd = ferodoxina. P_{680} şi P_{700} sunt centrii clorofilieni de reacţie ai fotosistemului II şi respectiv I (după Brock, 1988).

Cianobacteriile realizează o fotosinteză oxigenică, asemănătoare ca mecanism, cu a plantelor superioare. Celulele vegetative posedă ambele fotosisteme (I şi II), iar heterochiştii au numai fotosistemul I (nu fotolizează apa).

Cele două fotosisteme, în mod normal funcţionează corelat. În anumite condiţii, cianobacteriile realizează o *fotosinteză anoxigenică*, prin funcţionarea numai a fotosistemului I, obţinând potenţialul reducător din alte surse decât apa, aşa cum fac bacteriile verzi şi purpurii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reducerea CO_2 are loc în condiţii de anaerobioză, substratul donor de electroni fiind H_2 sau H_2S. În anaerobioză, cianobacteriile sintetizează hidrogenaza de înglobare, care oxidează H_2 şi reduc NADP la NADPH.

Unele cianobacterii realizează fotosinteza anoxigenică, folosind H_2S ca donor de electroni. Se formează S elementar, care rămâne extracelular, ca şi în cazul bacteriilor sulfuroase verzi.

În condiţii naturale, H_2S este un inhibitor al fotosistemului II şi al fotosintezei oxigenice, dar induce sinteza unei enzime care permite cuplarea reducerii fotosintetice a CO_2, cu oxidarea H_2S la S elementar. Această reacţie s-a observat în celulele de *Oscillatoria limnetica*, care face numai fotosinteză anoxigenică.

Fotosinteza bacteriană

Bacteriile fotosintetizante *sulfuroase verzi* (familia *Chlorobiaceae*, g. *Chlorobium*) sunt strict anaerobe şi folosesc H_2S ca donor de electroni. Rezultă sulf elementar, pe care îl oxidează la sulfat. Nu conţin nicodată incluzii intracelulare de S elementar. Reacţia globală a oxidării H_2S este următoarea:

$$CO_2 + 2\,H_2S\ (\text{lumina}) \rightarrow (CH_2O) + 2S + H_2O$$

Bacteriile *fotosintetizante purpurii* sunt *sulfuroase(Thiorhodaceae = Chromatiaceae))* şi *nesulfuroase(Athiorhodaceae = Rhodospirillaceae)*.

Bacteriile sulfuroase verzi (*Chlorobiaceae*) şi purpurii (*Chromatiaceae*) oxidează H_2S, H_2, tiosulfatul şi chiar substraturi organice (acizi dicarboxilici, acizi graşi, piruvatul). Ultimii au rolul nu numai de donori de electroni, ci sunt utilizaţi şi ca surse secundare de carbon, sursa pricipală rămânând CO_2.

Bacteriile *purpurii nesulfuroase (Rhodospirillaceae)* nu folosesc H_2S ca donor de electroni. Oxidează H_2, dar pentru nutriţia fototrofă, necesită prezenţa compuşilor *organici* în mediu (acizi organici, alcooli, glucide, compuşi aromatici), pe care îi utilizează atât ca donori de electroni cât şi ca surse de carbon. La lumină sunt fotoorganotrofe şi cresc în condiţii de anaerobioză. La întuneric cresc chimioorganotrof şi realizează un metabolism aerob.

Bacteriile fotosintetizante posedă un pigment fotosintetic particular, denumit *bacterioclorofilă*, repartizată în mici unităţi elementare denumite *cromatofori*, dispersaţi în citoplasma bacteriană.

În fotosinteza bacteriană, conversia cuantei de lumina în energie de legătură chimică evoluează ca o *fotofosforilare ciclică*, în care se sintetizează ATP şi se generează baze nucleotidice piridinice reduse (NADPH). Sinteza ATP şi generarea NADPH implică transportul electronilor printr-o catenă de transport, localizată în membranele suport ale pigmenţilor fotosintetizanţi. Transportorii de electroni ai catenei au localizare membranară şi sunt cuplaţi în serie, în ordinea creşterii potenţialului redox. Unele componente ale catenei de transport al electronilor în fotosinteză se regăsesc în catena de respiraţie.

În fotosinteza bacteriană, transportul electronilor este *ciclic*. Fluxul de electroni îşi are originea în molecula de *bacterioclorofilă*.

Clorofila în repaus are un potenţial redox pozitiv şi trebuie să reducă o moleculă acceptoare cu potenţial redox foarte scăzut. Este un transfer împotriva gradientului termodinamic.

Absorbţia unei cuante de lumină măreşte potenţialul energetic al clorofilei şi o transformă într-un reducător puternic. Electronul moleculei de clorofilă este cedat unui acceptor intermediar neidentificat (probabil, *bacteriofeofitinei a*, o *bacterioclorofilă a* fără Mg). Intermediarul este un reducător puternic (cu potenţial redox negativ) şi transferă electronul unor componente cu potenţiale redox progresiv mai mici (quinona, citocromi). Transferul este însoţit de eliberarea energiei. Sub acţiunea ATP-azei, care cuplează scăderea potenţialului redox, cu sinteza ATP, energia este stocată în molecula de ATP. Electronul se reîntoarce pe molecula de origine şi o readuce la potenţialul redox iniţial.

Centrul de reacţie al bacterioclorofilei este echivalent fotosistemului I de la plantele superioare şi de la cianobacterii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru fixarea CO_2, sinteza ATP nu este suficientă. Reducerea CO_2 necesită un potenţial reducător sub forma NADPH. Dar bacteriile nu fac fotoliza apei. NADPH este furnizat prin oxidarea compuşilor reduşi ai sulfului (H_2S, tiosulfat, sulf elementar), a H_2 sau a compuşilor organici (succinat, malat, butirat). Toate aceste molecule au un potenţial redox negativ, dar mai puţin negativ decât al cuplului NADP/NADPH. Oxidarea lor este cuplată cu generarea NADPH. Electronii rezultaţi din oxidarea lor intră în catena de transport al fotosintezei, la nivelul citocromilor şi reduc NADP la NADPH, cu consum de ATP.

Transportul electronilor de la donorii exogeni la un acceptor ($NADP^+$), cu potenţial redox foarte scăzut se numeşte *transport inversat*. El are loc cu consum de ATP şi este necesar fixării reductive a CO_2. ATP necesar reducerii NADP la NADPH, corespunde consumului energetic al reducerii CO_2. De exemplu, creşterea în prezenţa H_2S este însoţită de formarea sulfului elementar, care rămâne la exteriorul celulelor bacteriene sulfuroase verzi sau este depozitat intracelular de cele purpurii.

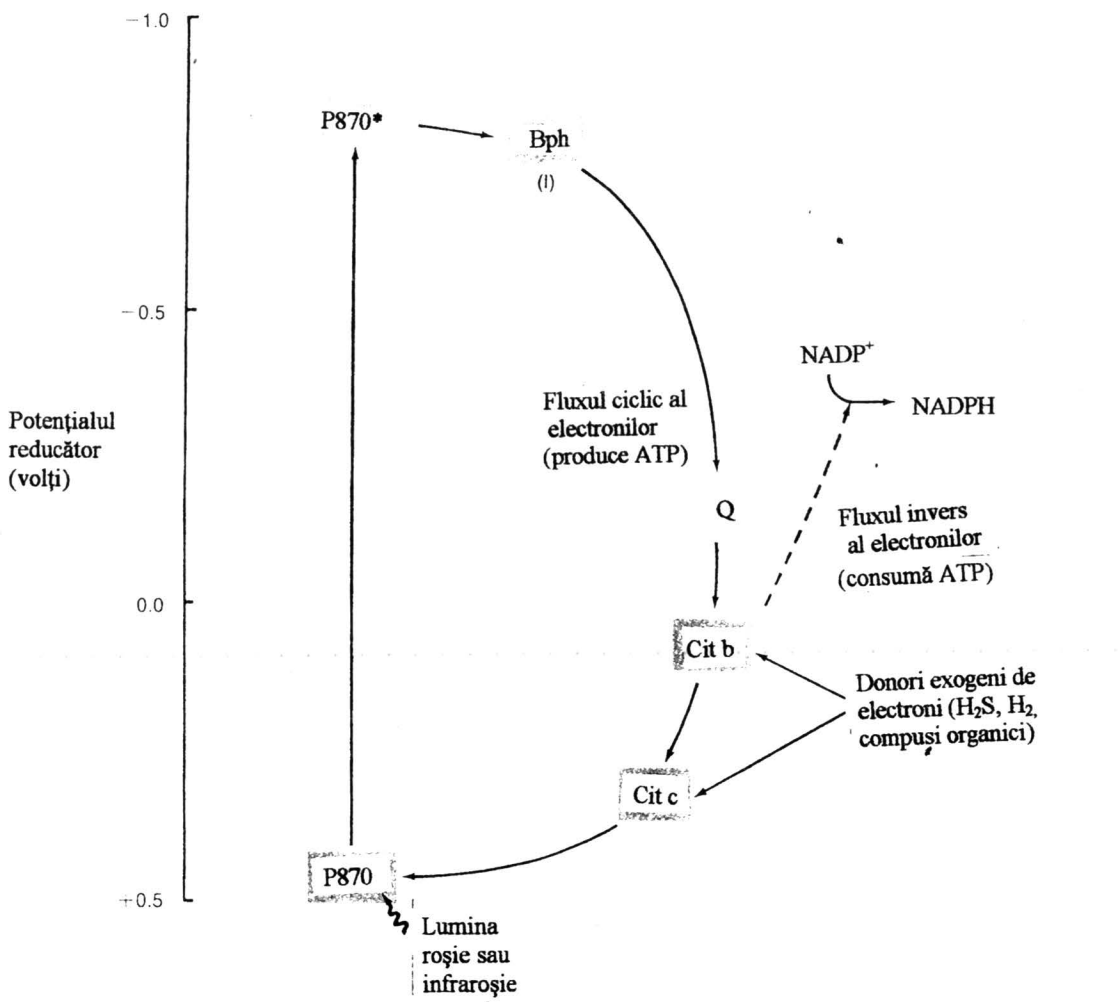


Fig. 49. Fluxul de electroni în fotosinteza anoxigenică a bacteriilor P_{870} = centrul de reacţie al bacterioclorofilei; Bph = bacteriofeofitină; Q = quinonă; Cit = citocrom (după Brock, 1988).

Fotosinteza bacteriană este un proces foarte restrâns în natură, dar probabil a fost foarte important în atmosfera primară a planetei, lipsită de O_2, bogată în H_2 şi a contribuit la acumularea substanţelor organice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Nutriţia chimiolitotrofă

Nutriţia chimiolitotrofă este cunoscută exclusiv la bacterii. Această modalitate de nutriţie are un rol deosebit de important în natură, deoarece reoxidează anumiţi compuşi minerali şi îi reintegrează în circuitul natural. Procesele de oxidare a unor substraturi anorganice sunt specifice anumitor tipuri de bacterii specializate sub raport fiziologic, Gram negative, adeseori mobile, unele strict aerobe.

Substratul anorganic oxidat are rolul de sursă de electroni (potenţial reducător), pentru reducerea CO_2, utilizat ca sursă de carbon. Acceptorul final de electroni este O_2.

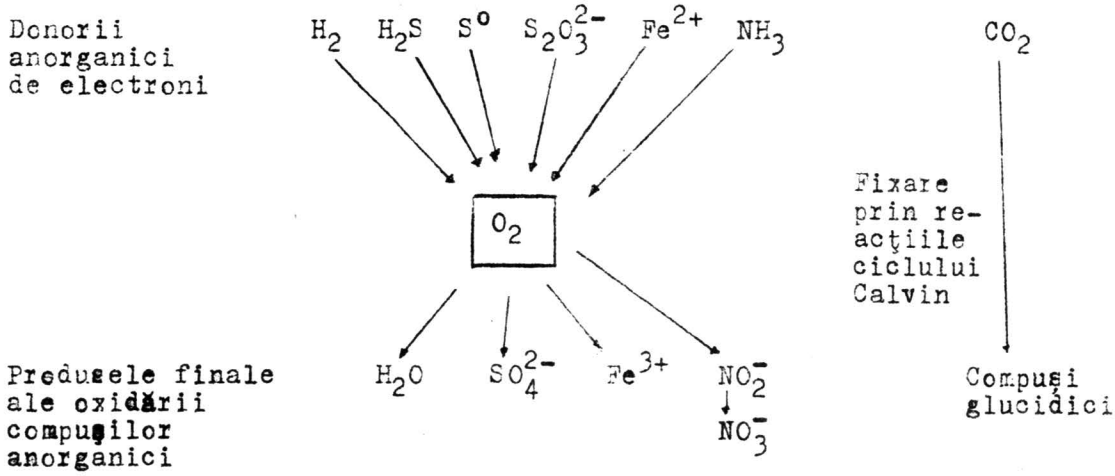


Fig. 50. Reprezentarea schematică a fluxului de electroni şi a CO_2 la bacteriile chimiolitotrofe.

Bacteriile care oxidează hidrogenul (Hidrogen-bacteriile)

Bacteriile hidrogen-oxidante aparţin g. *Pseudomonas, Alcaligenes* etc. şi sunt litotrofe facultative. Ele cresc fie ca heterotrofe pe seama compuşilor organici sau utilizează H_2 gazos ca donor de electroni. O_2 este acceptorul final de electroni, după reacţia globală:

$$H_2 + 1/2\ O_2 \rightarrow H_2O + E.$$

Energia rezultată este folosită pentru reducerea CO_2 la compuşi organici. Aceste bacterii sunt chimiolitotrofe facultative, deoarece se dezvoltă bine pe o gamă largă de substraturi organice, pe care le oxidează şi le utilizează ca donori de electroni şi ca surse de carbon, dar totdeauna îşi păstrează capacitatea de nutriţie chimiolitotrofă, prin oxidarea H_2 şi de a face asimilarea reductivă a CO_2 pe calea ciclului Calvin (calea ribulozo-fosfatului), după următoarea reacţie globală:

$$6\ H_2 + 2\ O_2 + CO_2 \rightarrow (CH_2O) + 5\ H_2O$$

Organismele care folosesc un compus anorganic ca sursă de energie şi un compus organic ca sursă de carbon se numesc *mixotrofe*.

Când cresc autrotrof, hidrogen-bacteriile fixează CO_2 prin seria de reacţii a ciclului Calvin, iar când cresc heterotrof, enzimele ciclului Calvin sunt represate şi se induce sinteza enzimelor implicate în oxidarea compusului organic.

Hidrogen-bacteriile conţin totdeauna în echipamentul lor enzimatic, una sau două *hidrogenaze*, enzime care leagă H_2 şi îl oxidează, fie pentru a produce ATP sau îl utilizează ca potenţial reducător pentru creşterea autotrofă. Unele sunt hidrogenaze legate de membrana citoplasmatică (sau "particulate"), iar altele au localizare citoplasmatică (sau "solubile").

Hidrogenazele legate de membrană au rol în metabolismul energetic. După legarea H_2 la situsul activ al enzimei, molecula este oxidată, iar protonii sunt transferaţi pe catena de respiraţie până la O_2.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Hidrogenazele citoplasmatice au rol în generarea potențialului reducător pentru creşterea autotrofă. Ele preiau H_2 şi reduc NAD^+ la NADH. Acesta este fosforilat, iar NADPH este utilizat ca reducător în ciclul Calvin. Toate hidrogenazele au Ni^{2+} în molecula activă.

Uneori hidrogenaza este bidirecțională: oxidează H_2 şi rezultă H^+ sau reduce H^+ şi rezultă H_2. Toate bacteriile fixatoare de N_2, au o hidrogenază care oxidează H_2. Rolul ei este de a readuce în fluxul energetic al celulei, H_2 care rezultă din activitatea nitrogenazei.

Multe bacterii heterotrofe oxidează H_2, folosindu-l ca potențial reducător, dar nu ca unică sursă de energie (de exemplu, *E. coli, Azospirillum*).

Unele hidrogen-bacterii, un grup fiziologic foarte specializat, folosesc CO ca unică sursă de energie şi îl oxidează la CO_2. CO_2 este fixat în reacțiile ciclului Calvin. Electronii care derivă din oxidarea CO intră în catena transportoare, la nivelul căreia se sintetizează ATP.

Bacteriile metanogene

Unele bacterii metanogene oxidează H_2 şi utilizează electronii şi energia rezultată pentru reducerea CO_2, la compuşi glucidici şi CH_4. Sunt organisme strict anaerobe.

Metanul este cel mai redus compus organic şi este rezultatul final al reacțiilor de reducere pe care le realizează bacteriile metanogene. Procesul are loc în mediile anaerobe: rumenul ierbivorelor, intestinul terminal al termitelor, în digestoarele (bazinele instalațiilor în care se face epurarea) de ape menajere, în sedimentele apelor marine şi dulci.

Cel puțin trei grupe fiziologice de bacterii formează un lanț trofic, în care acetatul este principalul intermediar metabolic. Bacteriile anaerobe fermentative şi acetogene degradează materia organică complexă la H_2, CO_2, acetat, formiat, acizi organici volatili. Alte bacterii anaerobe oxidează acizii la acetat şi H_2 sau la acetat şi formiat. În mediile anaerobe, bacteriile metanogene realizează treapta finală a lanțului trofic, producând CH_4 din CO_2 şi H_2. Ele au necesar crescut de Ni. O trăsătură fiziologică importantă a metanogenelor, este aceea că folosesc un număr limitat de substraturi simple pentru metanogeneză. Din această cauză, în cele mai multe habitate, metanogenele depind de conviețuirea în asociații cu alte bacterii anaerobe care convertesc materia organică complexă, la precursorii metanului.

H_2 şi CO_2 este singurul amestec pe care-l folosesc unele metanogene, dar multe foloesc formiatul, iar câteva utilizează acetatul, metanolul sau metilamina, dar nu folosesc CO_2 şi H_2.

Metanogenele consumă H_2 de origine *abiogenă în* ariile geotermale, în care H_2 este component al fluidului geotermal. Altă sursă abiogenă de H_2 este Fe metalic, care suferă spontan reacția chimică: $Fe^\circ + 2H^+ \rightarrow Fe^{2+} + H_2$.

Bacteriile metanogene sau metanobacteriile (*Methanobacterium, Methanosarcina, Methanospirillum)* produc metan printr-o reacție definitorie şi caracteristică grupului: reducerea CO_2 într-o reacție în care H_2 este utilizat ca donor de electroni. H_2 este oxidat într-o reacție producătoare de energie: $4\ H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O$. Circa 1/3 din cantitatea de CH_4 produsă în natură se formează prin această reacție, restul având originea în grupul metil al acetatului.

Metanobacteriile sunt chimiolitotrofe, deoarece se dezvoltă într-un mediu care conține apă şi o atmosferă formată din CO_2 şi H_2. Mecanismele reducerii CO_2 pentru sinteza compuşilor organici nu se cunosc.

Bacteriile metanogene produc metan nu numai prin reducerea CO_2, ci şi prin oxidarea unor substraturi organice:

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$$

$$4\ CH_3OH \rightarrow 3\ CH_4 + CO_2 + 2\ H_2O$$

Formiatul este un substrat energetic utilizat de multe bacterii metanogene, rezultând prin clivarea piruvatului la acetil-CoA şi formiat. Formiatul nefiind un precursor direct al metanului, este mai întâi oxidat la CO_2 şi H_2:

$$4\ HCOOH \xrightarrow{\text{Formiat-dehidrogenaza}} 4\ CO_2 + 4\ H_2$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cea de a II-a treaptă, CO_2 este redus la CH_4.

Cele mai bune substraturi naturale pentru producerea CH_4 sunt CO_2, H_2 şi acetatul. Acetatul, abundent în mediile naturale (în sedimente) este fermentat la CH_4 şi CO_2.

Metanolul este deasemenea un substrat bun pentru metanogeneză deoarece este precursor direct al CH_4.

Importanţa ecologică a bacteriilor metanogene

Bacteriile metanogene realizează importante reacţii terminale în habitatele anaerobe, modificând semnficativ proporţia produselor finale ale proceselor fermentative. Ele intră în competiţie cu alte bacterii consumatoare de H_2: cu cele sulfat-reducătoare şi cu cele acetogene.

Analiza gazelor conţinute în stratul de gheaţă din Groenlanda arată că valoarea concentraţiei atmosferice a CH_4 a fost stabilă (0,7 ppm) pe o perioadă de circa lo milenii. În ultimii 150-250 de ani, concentraţia metanului a crescut constant, ajungând la 1,6 ppm. Rata anuală a creşterii actuale este 1%. Creşterea concentraţiei atmosferice a CH_4, este un motiv de îngrijorare, deoarece acesta produce un puternic *efect de seră*. Deşi reprezintă numai 0,5% din cantitatea de CO_2, CH_4 contribuie cu circa 25% din efectul de seră.

CH_4 are rol în reacţiile chimice din stratosferă, care duc la formarea şi distrugerea O_3.

Sursele de CH_4 sunt biogene şi abiogene. O contribuţie deosebită o au bacteriile metanogene din rumenul rumegătoarelor. Orezăriile, ca şi ţinuturile naturale umede (turbăriile, tundra) sunt surse importante de CH_4. Depozitarea deşeurilor menajere este deasemenea o sursă majoră de CH_4. Recuperarea şi arderea CH_4 rezultat din degradarea materiei organice ar duce la creşterea concentraţiei atmosferice a CO_2, un gaz cu un coeficient de absorbţie mai mic în infraroşu şi cu un efect de seră mult mai scăzut.

Sursele abiogene de H_2 stimulează producerea biogenă a CH_4: H_2 din ariile geotermale şi cel rezultat din reacţia chimică spontană a Fe° metalic cu protonii:

$$Fe^{\circ} + 2\,H^{+} \rightarrow Fe^{2+} + H_2$$

Metanul atmosferic este rezultatul unor activităţi umane nebiogene: exploatarea minieră a cărbunelui şi arderea biomasei vegetale.

Bacteriile care oxidează sulful şi compuşii săi

Sulful este un element important pentru nutriţia microorganismelor, atât sub forma sa cea mai oxidată (SO_4^{2-}), cât şi cea mai redusă (S^{2-} din H_2S sau din sulfuri), dar şi în forma sa intermediară de sulf elementar (S°). Conversia sulfului de la o formă chimică la alta este predominant, rezultatul activităţii bacteriene.

Bacteriile sulf-oxidante (*Beggiatoa, Thiobacillus)* îşi obţin energia prin oxidarea sulfului elementar şi a diferiţilor compuşi anorganici ai săi. Sunt chimiolitotrofe facultative, deoarece se pot dezvolta şi organotrof în prezenţa unor substraturi organice.

Reacţiile de oxidare a donorilor anorganici de electroni sunt:

$$H_2S + 2\,O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2\,H^{+}$$
$$S^{\circ} + H_2O + 1/2\,O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2\,H^{+}$$
$$S_2O_3^{2-} + H_2O + 2\,O_2 \rightarrow 2\,SO_4^{2-} + 2\,H^{+}$$

În reacţiile de oxidare a H_2S, S° şi $S_2O_3^{2-}$, unul din produse este H^+, ceea ce determină scăderea pH şi mediul se acidifică. Se formează H_2SO_4 şi pH scade chiar sub valoarea 1.

Prin oxidarea H_2S (forma cea mai redusă a sulfului), se formează S° (sulf elementar) foarte instabil. Unele bacterii care oxidează H_2S, depun sulful elementar sub forma incluziilor citoplasmatice. S° constituie rezerva de energie, deoarece după epuizarea H_2S, celula îşi obţine energia prin oxidarea sulfului elementar din incluzii.

Sulful elementar adăugat în mediu este utilizat ca donor de electroni. Bacteriile sulfuroase cresc ataşate pe particula de sulf, datorită insolubilităţii S° şi îşi obţin energia prin oxidarea atomilor de sulf. Progresiv, pe masură ce este oxidată, particula de sulf trece în soluţie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În condiţii de autotrofie, bacteriile sulfuroase fixează CO_2 pe calea ciclului Calvin. Unele bacterii sulf-oxidante cresc numai în condiţii de mixotrofie. Ca sursă de energie folosesc H_2S şi un compus organic.

Bacteriile care oxidează compuşii fierului

Oxidarea aerobă a Fe, de la starea feroasă (Fe^{2+}) la cea ferică (Fe^{3+}) este o reacţie furnizoare de energie pentru unele bacterii.

Bacteriile din g. *Gallionella, Thiobacillus ferrooxidans* oxidează Fe^{2+} la Fe^{3+}. Cantitatea de energia rezultată din acest proces este mică, fiind folosită pentru fixarea CO_2. De aceea, bacteriile ferice trebuie să oxideze o cantitate mare de Fe^{2+} pentru creştere. Facultativ sunt organotrofe.

Fe^{3+} formează un precipitat ($Fe(OH)_3$), insolubil în apă. Bacteriile care oxidează compuşii Fe, oxidează şi compuşii sulfului şi sunt *acidofile obligate*, deoarece la pH neutru, în condiţii aerobe, Fe^{2+} este insolubil şi foarte instabil, deoarece se oxidează spontan la Fe^{3+}.

La pH neutru, Fe^{2+} este stabil numai în condiţii de anaerobioză. La pH acid, Fe^{2+} este stabil şi solubil în apă. De aceea, bacteriile care oxidează compuşii Fe sunt *acidofile obligate*.

Cea mai cunoscută bacterie chimiolitotrofă care oxidează atât compuşii fierului cât şi ai sulfului este *Th. ferooxidans*, foarte comună în apele acide.

O altă bacterie care oxidează compuşii Fe şi ai S este *Sulfolobus* (*Archaebacteria*). Se găseşte în izvoarele termale acide, în izvoarele de mină, la temperaturi de până la 100°. Oxidează Fe^{2+}, H_2S, S° şi diferiţi compuşi organici. Creşte autotrof şi heterotrof.

Bacteriile care oxidează amoniacul şi nitritul

Cei mai comuni compuşi anorganici, utilizaţi ca donori de electroni sunt NH_3 şi nitritul (NO_2^-), fiind oxidaţi în aerobioză de bacteriile nitrificatoare, cu o largă distribuţie în sol.

NH_3, rezultat în procesul de amonificare este oxidat la nitraţi, forma utilizabilă a compuşilor cu azot, de majoritatea plantelor şi microorganismelor. Oxidarea NH_3 la nitraţi este un proces biologic complex, denumit *nitrificare*, realizat de bacterii chemolitotrofe obligat aerobe, care nu tolerează prezenţa substanţelor organice în mediul de crestere. Efectul lor pare a fi chiar toxic, deoarece inhibă creşterea autotrofă.

Oxidarea biologică a NH_3 la nitraţi se desfăşoară în trepte:

- în prima etapă, NH_3 este oxidat la *nitriţi*, de către *nitritbacterii* (*Nitrosomonas, Nitrospira, Nitrosolobus*):

$$NH_3 + O_2 + 2H^+ + 2e^- \xrightarrow{\text{Amonium-monooxigenaza}} NH_2OH + H_2O.$$

În reacţie, cei doi e^- sunt necesari pentru reducerea unui atom de oxigen, la H_2O. Amoniacul este oxidat de amonium-monooxigenază (proteină membranară). Se formează NH_2OH (hidroxilamină) şi H_2O, iar hidroxilamin-reductaza (enzimă periplasmică) oxidează NH_2OH la NO_2^-, eliberând 4 electroni (*nitritarea*).

- în etapa a II-a, nitriţii sunt oxidaţi la *nitraţi*, de către *nitratbacterii* (*Nitrobacter):*

$$NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \text{ (nitratarea)}.$$

Cea mai mare parte a energiei este eliberată în prima etapă. Oxidarea NH_3 şi a NO_2 furnizează potenţialul reducător necesar fixării CO_2. O_2 este acceptorul final de electroni. Nitrit- şi nitrat-bacteriile trăiesc în asociaţii strânse în sol şi au rol important în fertilitatea acestuia.

Oxidarea unora dintre compuşii anorganici menţionaţi (H_2, NH_3, NO_2^-) este realizată şi de unele bacterii chimioorganotrofe (heterotrofe), dar ele nu cresc pe medii anorganice, deoarece nu pot utiliza CO_2 ca sursă de carbon. Din aparatul lor enzimatic lipsesc enzimele ciclului Calvin.

Deoarece moleculele anorganice pe care le oxidează conţin o cantitate mică de energie, microorganismele chimiolitotrofe se dezvoltă anevoios şi furnizează o masă celulară saracă. Pe

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de alta parte, fixarea reductivă a CO_2 în ciclul Calvin necesită un potențial reducător ridicat, pentru a aduce C din CO_2, la nivelul de oxidare caracteristic glucidelor.

Chimiolitotrofia este o proprietate fiziologică excepțională, prezentă numai la procariote. Bacteriile chimiolitotrofe convertesc CO_2 la compuși organici, în absența procesului fotosintetic.

Fixarea CO_2 la chimiolitotrofe. Ciclul Calvin

Calea principală prin care CO_2 este încorporat în substanțe organice a fost descrisă de Calvin, Benson și Basshan (1946), la algele verzi unicelulare *Chlorella pyrenoidosa* și *Scenedesmus obliquus*, utilizând CO_2 marcat cu C^{14}. Ciclul lui Calvin este cunoscut și sub denumirea de *ciclul ribulozodifosfatului (RuDP)*.

Toate organismele necesită carbon pentru sintezele celulare. Chiar și la heterotrofe, o parte a atomilor de carbon își are originea în CO_2. La autotrofe, tot carbonul organic provine din fixarea CO_2.

Fixarea CO_2 în ciclul Calvin are loc într-o serie de reacții ciclice, la întuneric, utilizând ATP și potențialul reducător sub forma NADPH, generate în reacțiile de fotosinteză (la lumină) sau în cursul proceselor de oxidare a substratului anorganic.

Reacțiile ciclului Calvin sunt cunoscute și sub denumirea de *ciclul reductiv al pentozelor*. Procesul fixării CO_2 se desfășoară în 4 faze:

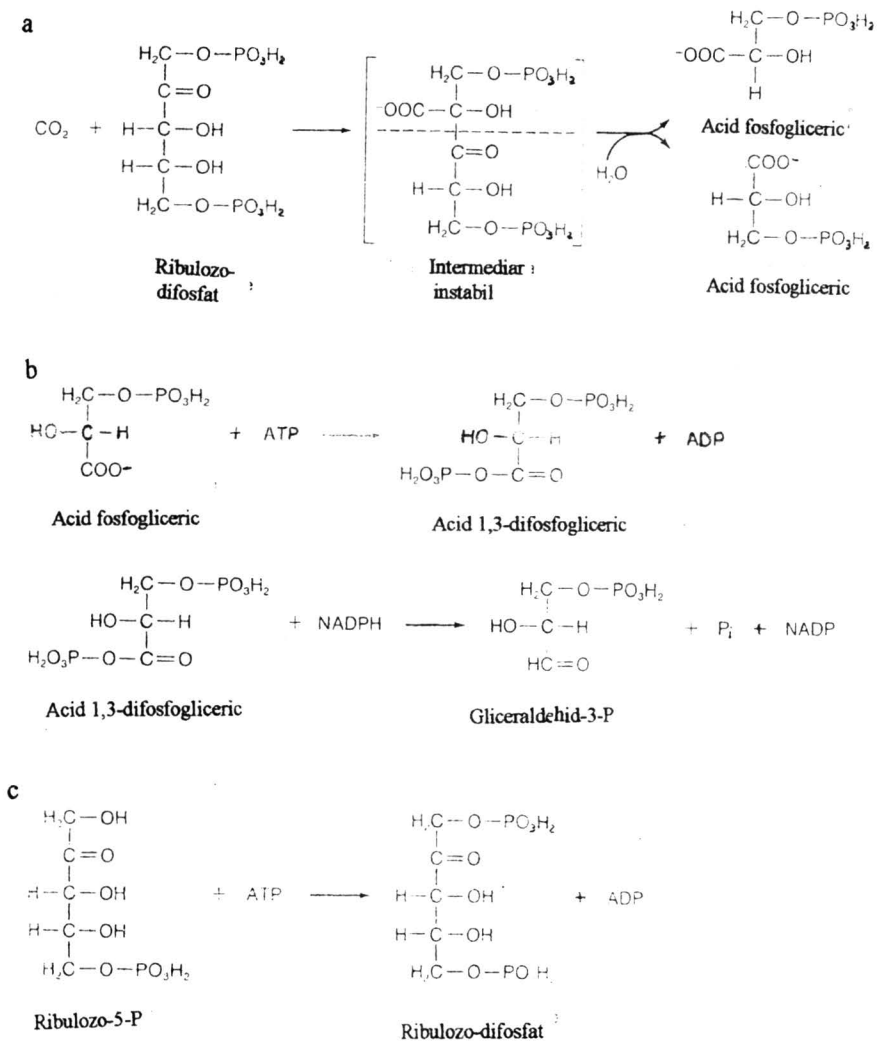


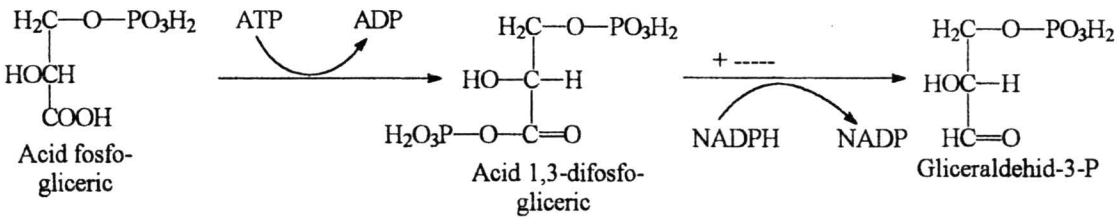
Fig. 51. Reacțiile enzimatice esențiale ale ciclului Calvin. a. Reacția catalizată de ribulozo-difosfat-carboxilază. b. Treptele coversiei acidului 3-fosfogliceric la gliceraldehid-3-fosfat. c. Conversia ribulozo-5-fosfatului, la ribulozo-difosfat, catalizată de fosfoibulokinaza (după Brock, 1988).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Enzima cheie a ciclului este ribulozo-1,5-difosfat carboxilaza, ce catalizează reacţia dintre CO_2 şi ribulozo-difosfat. Se formează două molecule de acid fosfogliceric. Atomul de C al CO_2 este încorporat în una din cele două molecule de acid fosfogliceric.

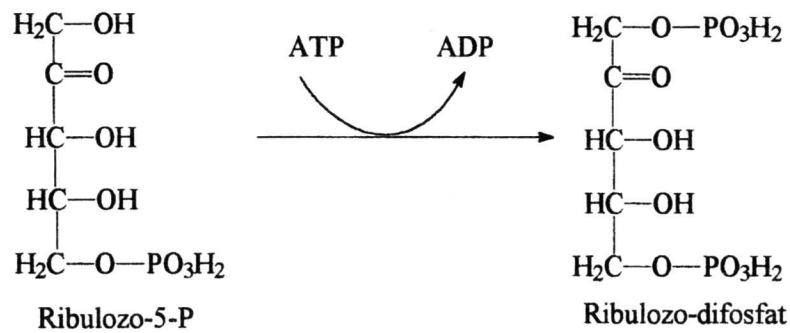
În faza a II-a, acidul fosfogliceric este redus la gliceraldehid-3P.

b) faza reducerii acidului fosfogliceric la gliceraldehid -3-P:



Atomul de C ajunge la nivelul reducerii din glucide.

c) Faza de *regenerare:*



d) faza de sinteză a materialului celular (din acidul 3-fosfogliceric se sintetizează glucide.

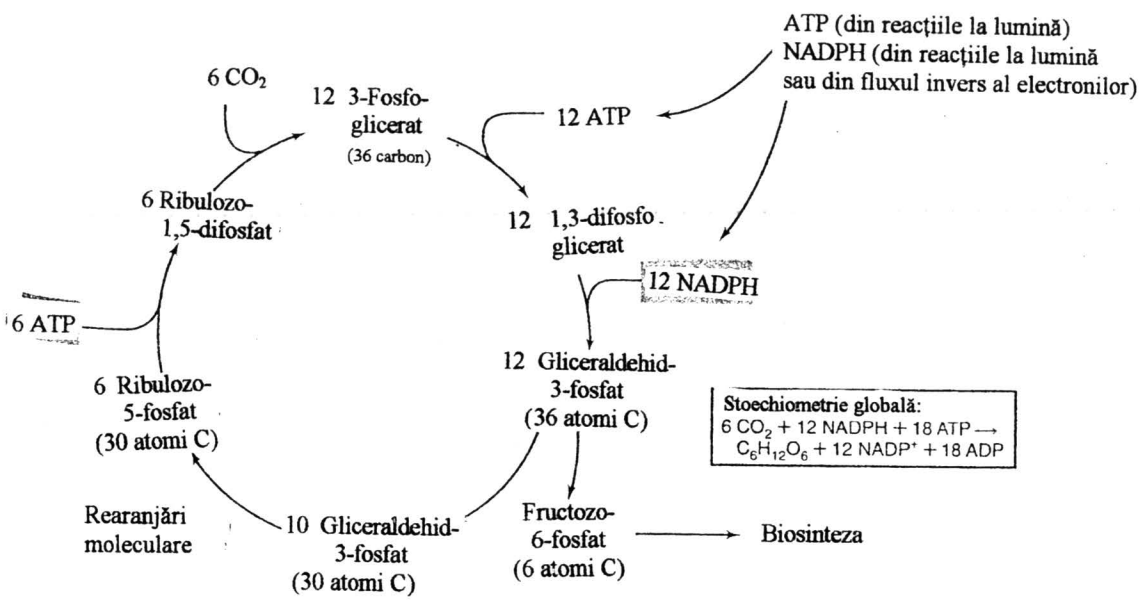


Fig. 52. Schema ciclului Calvin. Pentru fiecare 6 molecule de CO_2 fixate, este produsă o moleculă de fructozo-6-fosfat.

În reacţiile la lumină, ATP şi NADPH produse în exces sunt depozitate sub forma amidonului sau a altor compuşi glucidici. La bacteriile verzi, produsele de rezervă sunt glicogenul şi acidul poli-beta-hidroxibutiric.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Nutriţia organică a bacteriilor chimiolitotrofe

Microorganismele autotrofe utilizează CO_2 ca sursă unică sau majoră de C. Sursa de azot este NH_3, NO_3^- sau N_2. Din compuşii anorganici simpli, ele sintetizează toate moleculele organice caracteristice organismelor vii. Toate microorganismele autotrofe folosesc aceiaşi sursă de C (CO_2), dar sursa de energie este diferită. Unele sunt *litotrofe,* iar altele sunt *fototrofe.* Termenul "autotrof" semnifică posibilitatea utilizării CO_2 ca sursă de C.

Unele microorganisme autotrofe sunt *obligate.* Ele utilizează CO_2 ca sursă de C asimilabil, iar sursa de potenţial reducător este o substanţă anorganică redusă (pentru chimiolitotrofe) sau lumina (pentru fotolitotrofe).

Microorganismele autotrofe *facultative* au particularităţi fiziologice care le permit să crească autotrof sau heterotrof, în funcţie de condiţiile de mediu.

Numeroase fapte de observaţie au evidenţiat ca microorganismele "obligat" autotrofe nu se încadrează în definiţia clasică. Toate microorganismele considerate anterior a fi strict autotrofe, metabolizează şi compuşi organici, furnizaţi de mediul extern. Cel puţin o parte a carbonului celular poate fi obţinută din surse organice, care sunt utilizate preferenţial faţă de CO_2, dacă ele constituie un amestec în proporţii adecvate. Plasticitatea metabolică adaptativă a microorganismelor merge de la capacitatea de creştere autotrofă, până la cea de creştere heterotrofă, în funcţie de condiţiile de mediu.

Chimiolitotrofele, *in vitro,* au o capacitate limitată de a utiliza compuşii organici ca sursă de carbon şi energie. Compuşii organici nu pot înlocui în totalitate CO_2 ca sursă de carbon, cel puţin pentru izolatele proaspete de bacterii chimiolitotrofe. Compuşii organici sunt toxici pentru microorganismele chimilitotrofe, dar există diferenţe ale gradului de sensibilitate: un compus organic cu efect toxic pentru o specie de microorganisme poate fi stimulator pentru altele.

Aminoacizii sunt inhibitori ai creşterii. Mecanismul inhibitor este identic cu cel ce determină inhibiţia creşterii bacteriilor heterotrofe şi anume, dezechilibrul cantitativ al aminoacizilor. Mecanismul este sugerat de faptul că toxicitatea aminoacizilor individuali pentru chimiolitotrofele obligate, poate fi reversată de alţi aminoacizi sau de amestecul lor echilibrat.

La chimiolitotrofe, sursele organice de carbon înlocuiesc cel puţin parţial, CO_2. Piruvatul are efect toxic asupra microorganismelor chimiolitotrofe. Acetatul este cel mai bine utilizat dintre compuşii organici, iar aminoacizii şi zaharurile sunt asimilate într-o măsură mai mică. Totuşi, chimiolitotrofele manifestă o *dependenţă parţială de CO_2.* Compuşii organici satisfac numai parţial necesarul de carbon al acestor bacterii. Restul carbonului celular îşi are originea în CO_2 fixat în ciclul Calvin.

Capacitatea limitată a chimiolitotrofelor de a asimila compuşii organici s-a explicat prin absenţa mecanismelor ce mediază transportul diferitelor molecule nutritive.

În concluzie, relaţiile bacteriilor chimiolitotrofe cu compuşii organici sunt complexe şi acoperă un spectru larg, de la o utilizare minimală până la susţinerea completă a creşterii.

Nutriţia chimioorganotrofă (heterotrofă)

Majoritatea bacteriilor au o nutriţie de tip *chimioorganotrof.* Ele nu au capacitatea de a folosi moleculele anorganice simple ca sursă reducătoare şi potenţial reducător. Din punct de vedere fiziologic, sunt foarte heterogene. În raport cu bacteriile chimiolitotrofe, cele chimioorganotrofe au numeroase incapacităţi de sinteză şi în consecinţă sunt dependente de prezenţa în mediul de creştere, a compuşilor organici pe care îi folosesc ca sursă de carbon pentru sinteza propriilor molecule şi ca sursă de energie în reacţiile de catabolism aerob sau anaerob.

Mediul de creştere trebuie să asigure prezenţa metaboliţilor esenţiali pe care celulele nu-i pot sintetiza.

În concepţia actuală, unificatoare cu privire la metabolismul bacterian, practic toate bacteriile au nevoie de acelaşi set de metaboliţi *esenţiali,* deoarece căile metabolice sunt comune. Diferenţele între autotrofe şi heterotrofe constau în gradul diferit de complexitate a moleculelor pe care celulele le iau din mediu.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Bacteriile heterotrofe izolate din mediile naturale sunt *prototrofe*, adică se dezvoltă pe un mediu minimal care conţine o *sursă organică de carbon şi energie şi un compus anorganic cu azot.* Din aceşti compuşi, ele îşi sintetizează toţi metaboliţii esenţiali.

Experimental, prin mutageneză, din tulpinile prototrofe se obţin mutante *auxotrofe*, care necesită adăugarea în mediul nutritiv a unuia sau mai multor *factori de creştere*, datorită pierderii căilor corespunzătoare de sinteză.

Printre bacteriile heterotrofe, gradul de dependenţă faţă de complexitatea mediului este foarte variabil. La unele bacterii patogene, nevoia de compuşi organici complecşi este foarte mare şi de aceea nu pot fi cultivate decât pe medii la care se adaugă lichide biologice: ser sanguin, sânge, lichid ascitic.

Unele microorganisme heterotrofe (patogene sau saprobionte nu au fost cultivate pe medii inerte, oricât de complexe, ci numai pe un substrat viu (culturi de celule, ou embrionat, organisme animale). Heterotrofia este interpretată ca rezultat al unui proces de *evoluţie*, la care echipamentul enzimatic s-a simplificat, în sensul incapacităţii de a face biosinteza unor enzime, ceea ce se reflectă în incapacitatea de a face sinteza unor metaboliţi esenţiali. Aceşti metaboliţi trebuie adăugaţi în mediul de creştere.

În concluzie, echipamentul enzimatic al microorganismelor heterotrofe este mai simplu decât al celor autotrofe. În grupul larg al organismelor heterotrofe există de asemenea, o scară amplă a diversităţii capacităţilor de sinteză, de la cele prototrofe, capabile să crească pe medii minimale, până la cele cu incapacităţi multiple de sinteză a unor substanţe care trebuie adăugate în mediul de cultivare, denumiţi *factori de creştere* sau *vitamine* ale microorganismelor.

Capacităţile de biosinteză realizează un *continuum* descrescător de la microorganismele autotrofe care îşi sintetizează toţi metaboliţii esenţiali, la cele heterotrofe, dependente de numeroşi factori de creştere. Trecerea de la nutriţia autotrofă la cea heterotrofă o realizează microorganismele *prototrofe,* care cresc pe un mediu minimal ce conţine un compus organic (glucidic) ca sursă de carbon şi energie şi o sursă de azot anorganic.

Factorii de creştere

Noţiunea "factori de creştere" s-a definit odată cu constatarea că o serie de microorganisme se pot dezvolta numai dacă, în afară de sursele de azot şi de carbon propriu-zise, în mediu se mai adaugă o serie de substanţe esenţiale pentru metabolismul lor.

Factorii de creştere sunt metaboliţi esenţiali, indispensabili menţinerii viabilităţii şi creşterii, pe care microorganismele nu pot să-i sintetizeze. Sunt molecule mici, niciodată mari şi îndeplinesc următoarele funcţii:

- sunt *metaboliţi intermediari* în reacţiile de transfer de energie ;
- au rolul de *coenzime;*
- sunt precursori ai unor *molecule structurale.*

Factorii de creştere se definesc individual pentru fiecare linie bacteriană. Dată fiind unitatea fundamentală a mecanismelor biochimice ale tuturor celulelor bacteriene, necesarul de factori de creştere este *unitar* în întreaga lume bacteriană. Deosebirea esenţială constă în *originea lor.* Bacteriile *prototrofe* sintetizează toţi metaboliţii esenţiali pornind de la o sursă organică de carbon şi energie. La ele, factorii de creştere au origine *endogenă* şi nevoia celulei pentru aceste molecule este mascată.

Cele mai mari capacităţi de biosinteză, a tuturor factorilor de creştere le au bacteriile *autotrofe.* Cele prototrofe au capacităţi intermediare, iar cele heterotrofe au pierdut diferite capacităţi de biosinteză: unii factori de creştere pot fi sintetizaţi, dar alţii nu se sintetizează şi trebuie adăugaţi în mediul de creştere, din surse externe.

Nevoia de factori de creştere este individuală pentru fiecare tulpină bacteriană şi de aceea, noţiunea are un caracter relativ şi se defineşte numai în raport cu un mediu de bază.

După funcţia lor metabolică, principalii factori de creştere cunoscuţi, aparţin la două grupe principale:

- metaboliţi cu rol structural (aminoacizi, peptide, baze purinice sau pirimidinice şi acizi graşi;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- "vitamine" din categoria factorilor catalitici, denumite astfel datorită rolului analog cu acela al vitaminelor celulei eucariote.

Factorii de creştere cu *rol structural,* au acţiune *cantitativă*, adică nivelul creşterii culturii celulare este proporţional cu concentraţia factorului de creştere cu care se suplimentează mediul unei tulpini auxotrofe pentru factorul respectiv. Concentraţia de 10 μg/ml este optimă.

Purinele şi pirimidinele sunt componente ale nucleotidelor, dar se găsesc şi în alcătuirea unor coenzime. Ele pot fi adăugate în mediu sub forma bazei libere sau sub forma unui nucleozid. Forma nucleotidică (care conţine grupul fosfat) nu este disponibilă pentru celule, deoarece în această formă, compusul nu traversează membrana celulei.

Incapacitatea de a sintetiza un aminoacid este datorată absenţei enzimelor necesare catalizei reacţiilor corespunzătoare.

Factorii de creştere cu rol structural condiţionează desfăşurarea biosintezei macromoleculelor (proteine, acizi nucleici, lipide).

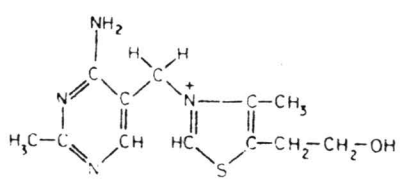
Factorii de creştere cu rol *catalitic* au acţiune *oligodinamică* şi de aceea sunt necesari în cantităţi foarte mici (1 μg/ml). Din această categorie fac parte *vitaminele*, care intră în alcătuirea coenzimelor. Majoritatea microorganismelor sintetizează toate componentele coenzimelor, dar cele cu una sau mai multe incapacităţi de sinteză trebuie aprovizionate cu aceste enzime sub forma vitaminelor.

Acidul para-amino-benzoic (APAB) este precursorul *acidului folic*, iar acesta, sub forma acidului tetrahidrofilic, are rol în metabolismul compuşilor cu un atom de carbon şi în transportul grupului formil şi metil.

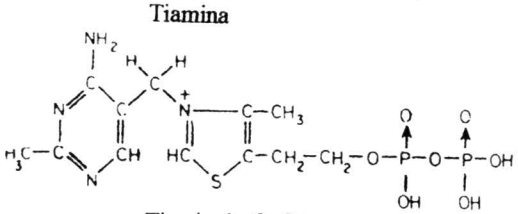
Biotina este o vitamină purtătoare a CO_2 în biosinteza acizilor graşi, în reacţiile de beta-decarboxilare şi în cele de fixare a CO_2 în reacţiile ciclului Calvin.

Acidul lipoic are rol în transferul grupării acil în reacţiile de decarboxilare a piruvatului şi alfa-cetoglutaratului.

Acidul nicotinic este precursorul NAD, la rândul său având rol în transferul electronilor în reacţiile redox.



Tiamina



Tiaminpirofosfat

Fig. 53. Structura chimică a tiaminei şi tiaminpirofosfatului.

Acidul pantotenic este precursorul coenzimei A. Coenzima A activează acetilul din diferiţii săi compuşi.

Tiamina (vitamina B_1) are rol în reacţiile de alfa-decarboxilare.

Riboflavina (vitamina B_2) este precursorul FMN şi FAD, componente ale flavoproteinelor, cu rol în transportul electronilor.

Piridoxina (vitamina B_6) are rol în transformările aminoacizilor şi cetoacizilor (coenzimă a reacţiilor de dezaminare şi decarboxilare).

Cobalamina (vitamina B_{12}) catalizează reacţia de sinteză a dezoxiribozei, fermentaţia glutamatului etc.

Vitamina K are rol în transportul electronilor şi în sinteza sfingolipidelor

Coenzima M (CoM) este necesară unor bacterii metanogene şi are rol în metanogeneză.

Hidroxamaţii sunt compuşi care leagă Fe, îl solubilizează din compuşii săi şi îl transportă în celulă.

Hematina (factorul X) intră în alcătuirea hemoproteinelor (citocromi, catalază) care au rol în transportul electronilor, pe catena de respiraţie celulară.

Factorii stimulatori de creştere sunt substanţe neesenţiale pentru creşterea şi multiplicarea unor microorganisme, după adăugarea lor în mediu. Microorganismele sintetizează aceste substanţe, dar în cantităţi insuficiente, care nu satisfac integral necesităţile dezvoltării optime a culturii. Prin urmare, creşterea are loc cu o rată scăzută. Adăugarea factorului stimulator al creşterii, restabileşte rata optimă de creştere şi diviziune a celulelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Semnificaţia biologică a factorilor de creştere. După A. Lwoff (1944) nevoia de factori de creştere ar reflecta procesul de evoluţie regresivă a unor microorganisme, prin pierderea selectivă a unor capacităţi de sinteză. Evoluţia organismelor ar fi însoţită în mod obligatoriu de pierderea unor funcţii, şi în special a celor de biosinteză.

Incapacitatea de sinteză poate fi de tip *calitativ* şi se manifestă prin dependenţa totală de un factor de creştere sau de tip *cantitativ*, ca o consecinţă a diminuării unei activităţi funcţionale, care continuă să se exprime într-o măsură detectabilă. Deficitul cantitativ se compensează prin suplimentarea mediului cu un factor stimulator al creşterii.

Aplicaţii practice. Nevoia de factori de creştere a unor microorganisme este atât de specifică, încât, dacă o tulpină a unui microorganism auxotrof se cultivă într-un mediu care conţine o cantitate limitată a unui factor esenţial, creşterea totală este proporţională cu concentraţia factorului respectiv în mediu. Asemenea tulpini de microorganisme care manifestă o dependenţă strictă şi specifică faţă de un factor al mediului, sunt folosite pentru dozarea cantitativă a factorului respectiv. Dozajul microbiologic este adesea singura posibilitate de evaluare cantitativă a unui factor de creştere. Metoda se bazează pe utilizarea unui mediu care satisface toate exigenţele nutritive ale tulpinii test, cu excepţia factorului care se dozează. Creşterea culturii este proporţională cu concentraţia factorului respectiv în mediu.

Metoda se aplică pentru dozarea aminoacizilor, tiaminei, riboflavinei, acidului pantotenic, acidului nicotinic, vitaminei B_{12}, biotinei, piridoxinei. Dozarea biologică este considerată a fi mai sensibilă decât oricare metodă chimică.

Dependenţa unor microorganisme de factorii de creştere este utilă în studiile *genetice*. Incapacitatea de sinteză a unui metabolit esenţial, este rezultatul unei *mutaţii*. Prin mutageneză, o tulpină bacteriană *prototrofă* (capabilă să crească pe un mediu minimal) generează linii *auxotrofe*, care necesită adăugarea în mediu, a factorului de creştere pe care nu-l poate sintetiza. De exemplu, o tulpină auxotrofă ce nu sintetizează histidina (His^-) necesită adăugarea acestui aminoacid în mediu.

Incapacitatea de sinteză poate fi *unică* (pentru un singur metabolit) sau *multiplă* şi constituie un *caracter marcant* (marker genetic) al tulpinii bacteriene. Tulpinile mutante auxotrofe sunt instrumente esenţiale de lucru în domeniul geneticii microorganismelor, deoarece permit studiul modalităţii de transmitere în descendenţă a unei capacităţi de biosinteză, detectabilă prin teste relativ simple de cultivare pe medii cu sau fără factori de creştere.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL IV

METABOLISMUL BACTERIAN

Metabolismul (*metabole*, grec = a schimba) este reprezentat de totalitatea reacţiilor biochimice implicate în activităţile biologice ale celulei bacteriene, prin intermediul cărora substanţele biogene sunt preluate din mediul extern şi sunt supuse reacţiilor producătoare de energie şi de biosinteză.

Substanţele sunt preluate din mediul extern, fie sub formă simplă, utilizabilă direct în metabolism, fie sub formă complexă. Substanţele biogene sunt folosite de celulă în următoarele direcţii esenţiale:

- pentru sinteza *metaboliţilor primari* (aminoacizi, baze purinice şi pirimidinice, acizi graşi), necesari biosintezei constituienţilor structurali, rezultatul fiind creşterea celulei;
- pentru *producerea energiei*, în metabolismul energetic şi a produselor metabolismului energetic (produşi de fermentaţie alcoolică, lactică, butirică, propionică, acidă etc.);
- pentru producerea (uneori) a *metaboliţilor secundari* (antibiotice, alcaloizi, ergotina, giberelina);
- pentru sinteza *moleculelor cu rol catalitic* (enzime).

Metabolismul celular cuprinde două tipuri de reacţii intim corelate:

- reacţii de *catabolism* (exergonice), denumite şi reacţii ale metabolismului energetic;
- reacţii de *anabolism* (endergonice), denumite şi reacţii de biosinteză. Rolul lor este de a asambla monomerii în macromolecule.

Cele două categorii de reacţii sunt strâns interconectate, în sensul că numeroşi intermediari ai reacţiilor de catabolism sunt utilizaţi în reacţiile de anabolism. Reacţiile metabolice sunt *amfibolice*.

Reglarea metabolismului bacterian este perfectă şi este subordonată principiului fundamental al activităţii celulare, principiul *optimalităţii*, care asigură desfăşurarea coordonată a activităţii celulare, astfel încât pierderea de energie să fie minimă

Reacţiile metabolice fundamentale ale celulelor bacteriene nu diferă mult de acelea care au loc în celula eucariotă. Totuşi bacteriile au o serie de particularităţi metabolice, în special ale *metabolismului energetic*, care este mult mai diversificat decât al celulei eucariote.

Particularităţile generale ale metabolismului bacterian

Metabolismul bacterian se distinge de acela al celulei eucariote prin câteva trăsături particulare:

1) Metabolismul bacterian are o *intensitate neobişnuită*, de sute şi chiar de mii de ori mai mare decât metabolismul organismelor superioare, raportat la unitatea de greutate (gramul). De exemplu, un gram de celule de *Micrococcus ureae* poate să metabolizeze până 1200 g uree într-o oră; un gram de bacterii lactice hidrolizează într-o oră până la 14 000 grame de lactoză. Dacă organismul uman ar avea o rată metabolică asemănătoare ar trebui să ingere câteva tone de alimente pe oră.

Diferitele căi metabolice şi activităţi enzimatice, la bacterii, se desfăşoară cu o intensitate deosebit de înaltă, proprie acestor organisme. Particularitatea derivă, în cea mai mare parte din valoarea înaltă a raportului *suprafaţă/volum* (greutate celulară). La bacterii, suprafaţa este foarte mare în raport cu volumul, ceea ce uşurează schimburile între celulă şi mediu. Suprafaţa de schimb, prin care substanţele nutritive pătrund în celulă, iar cataboliţii sunt eliminaţi, este foarte mare în raport cu volumul celulei, care reprezintă consumatorul.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) *Natura substratului* pe care bacteriile îl pot cataboliza este foarte diversă. Bacteriile reprezintă grupul cel mai *omnivor* din întreaga lume vie. Ele metabolizează substanţe inaccesibile pentru alte organisme, de la substanţe anorganice simple, inclusiv substanţe toxice pentru sistemele biologice, până la substanţe organice complexe: cauciucul, asfaltul, fenolii, parafinele, petrolul, lemnul, substanţele antibiotice, cheratina, detergenţii, masele plastice. Reprezentanţi ai g. *Pseudomonas* pot metaboliza până la 200 substanţe diferite. Diversitatea chimică a substanţelor pe care bacteriile le pot metaboliza, a condus la reutilizarea şi valorificarea substanţelor menajere pentru obţinerea biogazului carburant, a biomasei bacteriene.

Această particularitate a bacteriilor ca grup, de a metaboliza substraturi foarte diverse, nu este estompată de unele bacterii, adevăraţi "specialişti fiziologici", care au exigenţe nutritive stricte şi nu pot folosi decât un singur substrat pentru activităţile lor metabolice: nitrit- şi nitrat bacteriile implicate în circuitul azotului, se dezvoltă numai în prezenţa substratului corespunzător sau bacteriile celulozolitice cresc numai în prezenţa celulozei.

3) *Plasticitatea metabolismului* bacterian este fără echivalent în lumea vie şi se referă la capacitatea bacteriilor de a folosi, alternativ, diferite surse de carbon şi energie. Foarte multe microorganisme, considerate ca strict autotrofe (capabile să utilizeze numai substanţe anorganice pentru nutriţie), sunt de fapt facultativ heterotrofe şi pot folosi substanţele organice ca substrat generator de potenţial reducător. La rândul lor, microorganismele heterotrofe (organotrofe), în absenţa substanţelor organice utilizează compuşi anorganici.

Aceasta versatilitate metabolică are caracter adaptativ şi are o semnificaţie ecologică majoră, deoarece, cel puţin în condiţii naturale, microorganismele trebuie să-şi adapteze tipul de metabolism în raport cu substratul disponibil.

4) Corelat direct cu intensitatea metabolismului, *potenţialul de sinteză* al celulei bacteriene este deosebit de mare, ca o consecinţă a faptului că transcrierea este simultană cu traducerea informaţiei genetice. Dacă potenţialul de sinteză, exprimat în kg/zi, în mod convenţional, la bovine îl considerăm a avea valoarea 1, la soia este 10, la levuri este 10^5, iar la bacterii este 10^{11}, raportat la unitatea de greutate. O celulă de *E. coli* sintetizează circa 1000 molecule de proteine/secundă, circa 4000 molecule de lipide şi 4 molecule de ARN. Acest uriaş potenţial de sinteză este numai *teoretic* şi ar putea deveni real numai în condiţii optime de mediu. În condiţii obişnuite de mediu, acest potenţial excepţional de sinteză se manifestă o perioadă foarte scurtă de timp, datorită factorilor limitanţi ai mediului: diminuarea cantitativă a nutrienţilor, acumularea rapidă a substanţelor toxice şi de catabolism, modificarea pH, variaţiile de temperatură.

5) Metabolismul bacterian se caracterizează prin *diversitatea căilor catabolice* alternative, prin care poate fi degradat un compus chimic: calea glicolizei, a şuntului hexozo-monofosfaţilor, calea Entner-Doudoroff.

Toate substanţele nutritive utilizabile în metabolism, trebuie să strabată învelişurile celulare: peretele şi membrana citoplasmatică. Membrana citoplasmatică are o permeabilitate foarte selectivă, fiind o barieră nu numai fizică, ci şi chimică şi biologică.

Microorganismele preiau moleculele mici din mediu: glucide, aminoacizi, oligopeptide, nucleozide, fosfaţi organici cu moleculă mică (glicerol-fosfat). Macromoleculele sunt mai întâi degradate la exteriorul celulei. Bacteriile, fungii şi protozoarele produc enzime extracelulare (exoenzime), pe care le elimină în mediu sau rămân legate de structurile de suprafaţă ale celulei. Exoenzimele hidrolizează moleculele mari, rezultând oligomeri sau monomeri, pentru care structurile celulare de înveliş sunt permeabile. În cazul microorganismelor patogene, exoenzimele atacă ţesuturile constitutive ale gazdei şi reprezintă un factor major de virulentă.

Exoenzimele sunt *hidrolaze*: polizaharidaze (amilază, celulază, pectinază), mucopolizaharidaze (hialuronidază, chitinază, neuraminidază, lizozim), nucleaze, lipaze, fosfolipaze, proteaze.

La bacteriile Gram negative, sediul exoenzimelor este spaţiul periplasmic. Ele trăiesc în medii sărace în substanţe nutritive, care sunt hidrolizate în compartimentul periplasmic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Metabolismul energetic bacterian

Metabolismul celulei bacteriene, ca şi al celulei eucariote are două compartimente fundamentale:

- căile de producere a energiei, denumite *catabolice sau degradative*;
- căile consumatoare de energie, denumite *anabolice sau de biosinteză*.

Deoarece căile catabolice şi anabolice sunt strâns interconectate prin intermediul unor compuşi cheie ai metabolismului intermediar, adevărate "plăci turnante" ale metabolismului, denumirea comună de "căi amfibolice" este justificată.

La bacterii, datorită ratei foarte înalte a metabolismului, funcţionează o categorie specială de căi, denumite *anaplerotice* (sau de alimentare), menite să aprovizioneze o cale metabolică ce funcţionează intens, cu produsul intermediar necesar.

Căile catabolice reprezintă ansamblul proceselor biochimice prin care are loc degradarea nutrienţilor preluaţi din mediu şi eliberarea energiei. Complexitatea reacţiilor catabolice este variabilă, în funcţie de natura şi complexitatea substanţelor supuse proceselor de degradare.

În general, reacţiile catabolice degradative ale unei macromolecule se desfăşoară în trei faze succesive:

- în prima fază se desfăşoară reacţiile biochimice în cursul cărora macromoleculele nutritive sunt *scindate* la subunităţile lor de construcţie: din polizaharide rezultă mono- şi dizaharide; din proteine rezultă aminoacizi şi oligopeptide; lipidele sunt hidrolizate în glicerol (şi alţi alcooli) şi acizi graşi. În această etapă se eliberează numai 1% din energia macromoleculei, care se pierde sub formă de caldură. Procesul se desfăşoară la nivelul structurilor de înveliş ale celulei, sau chiar extracelular, sub acţiunea exoenzimelor hidrolitice;
- în cea de a II-a etapă, monomerii sunt degradaţi pe căi *specifice* şi rezultă un număr limitat (circa 12) de molecule mici, denumite *intermediari metabolici* ai căilor centrale, aceiaşi la diferite tipuri de bacterii. În această etapă se eliberează circa 1/3 din energia moleculară;
- cea de a III-a fază este diferită în funcţie de natura reacţiilor metabolice: în aerobioză, reacţiile evoluează în sensul metabolizării integrale a compuşilor, până la CO_2 şi H_2O, cu eliberarea întregii cantităţi de energie. În anaerobioză, reacţiile evoluează după modelul proceselor fermentative şi cantitatea de energie care se eliberează este mică.

Reacţiile catabolice sunt exergonice: ele realizează tranziţia unei molecule de la o stare mai puţin stabilă, cu un conţinut mai mare de energie, la molecule mai mici şi mai stabile, cu un conţinut mai mic de energie.

Tipuri de metabolism energetic în funcţie de acceptorul final de electroni

În funcţie de natura acceptorului final de electroni, microorganismele pot prezenta trei tipuri de metabolism energetic:

- metabolism energetic de tip *aerob* (oxibiotic) sau *metabolism respirator*, propriu microorganismelor al căror acceptor final de electroni, la capătul catenei de respiraţie, este O_2;
- metabolism energetic *anaerob* (anoxibiotic), caracteristic microorganismelor al căror acceptor final de electroni este un compus anorganic;
- metabolism energetic de tip *fermentativ*, caracteristic microorganismelor la care, atât donorii cât şi acceptorii finali de electroni sunt compuşii organici.

Pentru nevoile curente ale cultivării microorganismelor în condiţii de laborator sunt recunoscute următoarele *tipuri respiratorii*:

- bacterii *strict aerobe* sunt acelea care care necesită O_2 molecular ca acceptor final de electroni. Ele realizează metabolism de tip oxidativ şi nu cresc în absenţa O_2;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- bacteriile *microaerofile* folosesc O_2 ca acceptor final de electroni, dar concentraţia naturală a O_2, de 20-21% este prea mare şi din această cauză nu cresc pe suprafaţa mediului expusă aerului atmosferic, dar nu cresc nici în anaerobioză;
- bacteriile *facultativ anaerobe* îşi obţin energia pe cale oxidativă, folosind O_2 ca acceptor final de electroni, dar cresc şi în condiţii de anaerobioză şi îşi obţin energia pe cale fermentativă;
- bacteriile *anaerobe* nu folosesc O_2 molecular ca acceptor de electroni. În interiorul acestui grup se disting câteva diviziuni fiziologice:
  a) bacteriile *anaerobe aerotolerante* cresc puţin (dar cresc) în condiţii de aerobioză, într-o ambianţă care conţine între 2-8% O_2. Creşterea optimă are loc în anaerobioză (de exemplu, bacteriile lactice);
  b) bacteriile *anaerobe stricte* nu cresc în prezenţa unei concentraţii mai mari de 0,5% O_2. Din această cauză, cultivarea lor se face în recipiente din care O_2 se elimină complet, pentru a crea un potenţial redox scăzut.

Efectul toxic asupra bacteriilor anaerobe îl exercită O_2 şi nu potenţialul redox ridicat al mediului. Pentru diminuarea potenţialului redox al mediului, în mediul de creştere se adaugă agenţi reducători (acidul tioglicolic, cisteină) sau alături de mediu, în atmosfera închisă a recipientului de cultivare (pirogalolul). Agenţii reducători consumă O_2 dizolvat în mediu sau existent în atmosfera recipientului şi scad valoarea potenţialului redox.

Efectul toxic al O_2 asupra bacteriilor anaerobe este datorat, de fapt, derivaţilor rezultaţi din reducerea O_2: H_2O_2, O_2^- (radicalul superoxid), OH^- (ionul hidroxil), $OH^{\cdot}$ (radicalul hidroxil), $^1O_2$ (oxigen singlet). Oxigenul singlet se formează după ce molecula de O_2 absoarbe o cantitate de energie. În molecule, în general, electronii apar în perechi stabilizate, cu spini de direcţie opusă. O_2 este o moleculă neobişnuită, prin faptul că spinii electronilor au aceiaşi direcţie. Absorbţia energiei schimbă unul din electroni pe un orbital cu energie mai înaltă şi se produce inversia spinului.

Reacţii de oxidare a substratului energetic

Din punct de vedere chimic, metabolismul energetic este o înlănţuire de reacţii de oxido-reducere, în cursul cărora substratul energetic este oxidat. Reacţiile de oxidare sunt de trei tipuri:

1. *Reacţia de oxidare consecutivă pierderii de electroni*. De exemplu, Fe^{2+} (feros), forma redusă este oxidată la Fe^{3+} (feric), după reacţia: $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^- + \text{Energie}$.

2. *Reacţii de oxidare catalizate de dehidrogenaze*, în care molecula oxidată pierde simultan protoni şi electroni; de exemplu, oxidarea alcoolilor la aldehide:

$$R\text{-}CH_2OH \rightarrow R\text{-}CHO + 2\,H^+ + 2\,e^- + \text{Energie}$$

3. Reacţia de oxidare care *comportă câştig de atomi de oxigen* de către substratul oxidat; de exemplu, oxidarea aldehidelor la acizi:

$$R\text{-}CHO + H_2O \rightarrow RCOOH + 2\,H^+ + \text{Energie},$$

sau reacţia de decarboxilare oxidativă a piruvatului, la acetat şi CO_2:

$$CH_3\text{–}CO - COOH + H_2O \rightarrow CH_3 - COOH + CO_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- + \text{Energie}$$

Aceste reacţii de oxidare constau într-o dehidrogenare, în care apa are, în acelaşi timp, rolul de donor de oxigen şi de sursă de protoni şi electroni.

Toate reacţiile de oxidare biologică au comun faptul că, în esenţă, ele semnifică o pierdere de electroni de către substrat şi eliberarea energiei.

Electronul cedat de un substrat molecular trebuie obligatoriu sa fie acceptat de un alt substrat, astfel încât reacţiile de oxidare biologică sunt cuplate totdeauna cu reacţii de reducere, formând un cuplu de *oxido-reducere* (un *sistem redox*), în care o moleculă se comportă ca donoare de electroni, iar cealaltă, ca acceptoare.

Molecula care cedează electronii sau protonii (H^+) se *oxidează*, iar cea care îi acceptă se *reduce*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Potenţialul redox şi generarea energiei

Deoarece dehidrogenările sunt foarte importante în reacţiile de oxido-reducere biologică, termenii de donor de H^+ şi de acceptor de H^+ sunt folosiţi ca sinonimi cu cei de donor şi respectiv de acceptor de electroni.

Tendinţa unui compus chimic de a ceda sau de a accepta electroni în reacţiile de oxido-reducere biologică se exprimă cantitativ prin potenţialul oxido-reducător (redox) al cuplului. Electronii sunt transportaţi totdeauna de la un cuplu cu un *potenţial redox mai negativ*, la un cuplu cu un potenţial redox mai puţin negativ (de exemplu, de la cuplul NADPH + H^+, la cuplul Fe^{2+}/Fe^{3+}).

În natură, mediile bogate în O_2 au un potenţial redox de + o,82 V, iar cele bogate în H, au un potenţial de – 0,42 V.

Ca regulă generală, substraturile cu potenţial redox pozitiv (O_2, Fe^{3+}) sunt oxidante (acceptoare de electroni), iar cele cu potenţial redox negativ (H_2, NADH) sunt agenţi reducători (donori de electroni).

O substanţă chimică, cu cât este mai redusă, cu atât conţine o cantitate mai mare de energie şi cu atât este mai mare tendinţa ei de a ceda electroni.

Transferul protonilor (H^+) şi al electronilor în sistemele biologice, se face de la substratul energetic la O_2. Dacă acest transfer s-ar face direct de la substratul redus la O_2, diferenţa maximă de potenţial ar fi de 0,82 – (- 0,42) = 1,23 V, ceea ce ar corespunde unei diferenţe energetice de 5 kcal/mol. Un astfel de transfer ar fi însoţit de o pierdere foarte mare de energie.

Microorganismele (ca şi celelalte organisme) dispun de mai multe *sisteme redox*, care transportă electronii în cascadă, permiţând eliberarea treptată a energiei. În dublul strat fosfolipidic sunt inserate *sistemele redox* – proteine cu rol de transport în catena de respiraţie celulară: flavoproteine, quinone, proteine cu Fe-S, citocromii. Transportorii de electroni sunt astfel orientaţi în membrană, încât realizează o separare a protonilor de electroni. Atomii de H , la nivelul transportorilor specifici (NADH, NADPH), pe faţa internă a membranei sunt disociaţi în protoni (H^+) şi electroni. Electronii se întorc pe faţa citoplasmatică a membranei prin transportorii specifici (citocromii), iar protonii sunt eliminaţi la exteriorul celulei. La capătul catenei de respiraţie celulară, electronii reduc acceptorul final (O_2). O_2 redus necesită H^+ din citoplasmă pentru formarea apei. H^+ citosolic provine din disocierea apei în H^+ şi OH^-. Consumul H^+ determină acumularea OH^- pe faţa internă a membranei.

H^+ şi OH^- se generează pe feţele opuse ale membranei citoplasmatice. Rezultatul net al distribuţiei asimetrice a acestor ioni, este generarea unui gradient de pH şi a unui potenţial electric de membrană. Faţa internă a membranei are sarcină negativă şi este alcalină, datorită ionului OH^- (derivat din disocierea apei), iar faţa externă are sarcină pozitivă şi este acidă (datorită protonilor).

Gradientul pH şi potenţialul electric reprezintă o stare energizată a membranei (asemănătoare unei baterii). Energia este utilizată pentru transportul ionilor, pentru mişcarea flagelilor, pentru sinteza ATP. Starea energizată a membranei se poate exprima ca *forţă proton-motrice*.

NAD, flavin-enzimele şi quinonele transportă electroni şi protoni, iar proteinele cu Fe-S şi citocromii transportă numai electroni.

În membrană, transportorii au orientare vectorială, astfel încât protonii sunt descărcaţi în mediul extern, iar electronii sunt transferaţi la acceptorul citoplasmatic. În citoplasmă se acumulează OH^-.

Ansamblul reacţiilor metabolismului energetic funcţionează pe principiul conservării unei cantităţi cât mai mari de energie eliberată din substratul energetic, în reacţiile catabolice.

Energia este conservată prin sinteza ATP din ADP, prin acţiunea ATP-sintetazei, localizată pe faţa citoplasmatică a membranei. Enzima este un complex (format din cel puţin 10 lanţuri polipeptidice) şi are acţiune reversibilă pentru că sintetizează ATP din ADP şi Pi, dar catalizează şi reacţia inversă, de hidroliză a ATP la ADP, Pi, cu eliberarea energiei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

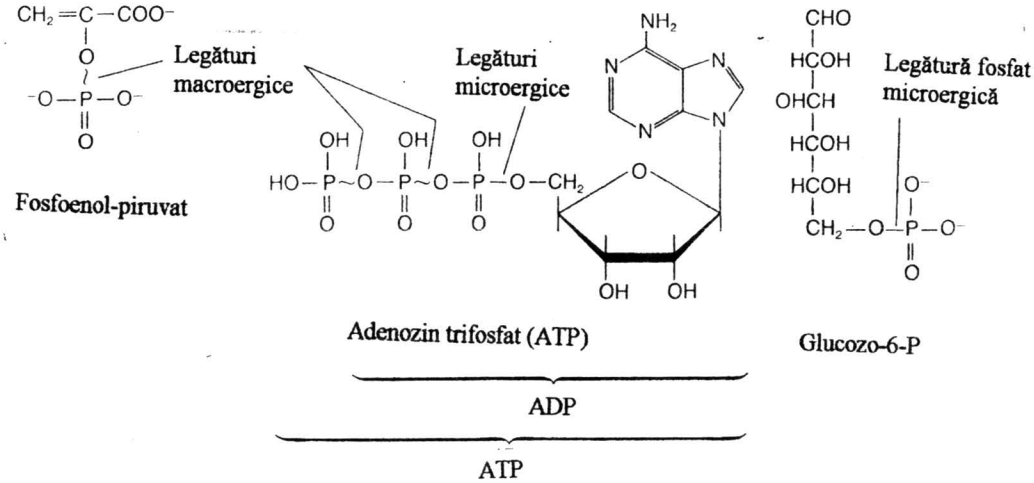


Fig. 54. Legături fosfat macroergice din moleculele de fosfoenolpiruvat şi de ATP. Prima moleculă de acid fosforic legată de adenozină, ca şi cea din glucozo-fosfat au potenţial energetic scăzut.

Oxidarea glucozei

Căile metabolismului energetic care realizează oxidarea unui substrat, formează un ansamblu de reacţii catabolice comune la numeroase bacterii. Substratul energetic cel mai comun al căilor de oxidare este glucoza.

În prima etapă a reacţiilor de degradare, ce au loc în citoplasmă, glucoza este oxidată la *piruvat*, cedând 4 electroni, unui transportor solubil (NAD sau NADP), după următoarea reacţie generală:

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ CH_3 - CO - COOH + 2\ NADH + 2\ H^+$$

Piruvatul este advărata "placă turnantă" a metabolismului şi este produs pe diferite căi enzimatice:

- calea Embden –Meyerhof (calea hexozo-difosfaţilor, EMP);
- calea hexozo-monofosfaţilor (sau calea pentozo-fosfaţilor, a şuntului oxidativ sau fosfo-gluconatului, HMP);
- calea 2-ceto-3-deoxi-gluconatului sau calea Entner-Doudoroff (ED), deasemenea proprie microorganismelor.

La anumite trepte ale căilor de oxidare se produc câteva molecule de ATP, prin reacţiile de fosforilare la nivelul substratului: pe calea EMP se sintetizează 2 molecule de ATP, pe calea HMP – o moleculă de ATP, iar pe calea ED nu se sintetizează ATP.

La microorganismele aerobe, oxidarea glucozei la piruvat este completată prin acţiunea enzimelor ciclului Krebs, care realizează oxidarea completă a piruvatului la CO_2. Enzimele ciclului Krebs sunt situate, în principal sau exclusiv, la nivelul membranei citoplasmatice.

Prima etapă, care nu face parte din ciclul Krebs, constă în decarboxilarea oxidativă a piruvatului la acetat, cuplată cu coenzima A. Reacţia este catalizată de piruvat-dehidrogenază, cu localizare membranară, existentă numai la bacteriile aerobe.

Acetil-CoA rezultă şi din metabolismul aminoacizilor şi al acizilor graşi. Acetil-CoA se condensează cu oxalo-acetatul şi intră în ciclul acizilor tricarboxilici (TCA), în care se regenerează oxalo-acetatul.

Reducerea acceptorului final de electroni

Electronii cedaţi de substratul energetic, în cursul oxidării parţiale sau complete sunt transportaţi de coenzimele reduse: de cele mai multe ori NADH, uneori NADPH, iar FADH numai în cazul succinat-dehidrogenazei, care oxidează succinatul la fumarat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Coenzimele reduse sunt reoxidate prin transferul electronilor, unui acceptor final.

În funcţie de natura transportorilor de electroni şi a acceptorului final se cunosc trei tipuri de reacţii metabolice:

- reacţii metabolice de tip *respirator*, în cursul cărora electronii sunt transportaţi pe catena de respiraţie celulară, până la O_2, care este acceptorul final de electroni. Transportul este însoţit de fosforilări oxidative (sinteza ATP);
- reacţii metabolice de tip *anaerob*, deasemenea dependente de citocromii catenei de respiraţie celulară, dar acceptorul final de electroni este un substrat anorganic oxigenat (nitratul, sulfatul, carbonatul);
- reacţii metabolice de tip *fermentativ* sunt acelea care au loc numai în condiţii de *anaerobioză,* dar acceptorul final de electroni este un compus organic (de exemplu, piruvatul). La bacteriile fermentative lipseşte lanţul citocromilor din catena de respiraţie, pentru transportul electronilor. Substratul acceptor este redus la produse de fermentaţie (de exemplu, piruvatul este redus la lactat). Reducerea acceptorului final este cuplată cu reoxidarea coenzimelor.

Respiraţia aerobă bacteriană

Respiraţia aerobă este procesul catabolic producător de energie în cursul căruia, compuşii energetici organici sau anorganici reduşi, cu rolul de *donori* de electroni sunt degradaţi complet pe cale oxidativă până la CO_2 şi H_2O. În respiraţia aerobă, O_2 este ultimul acceptor de electroni.

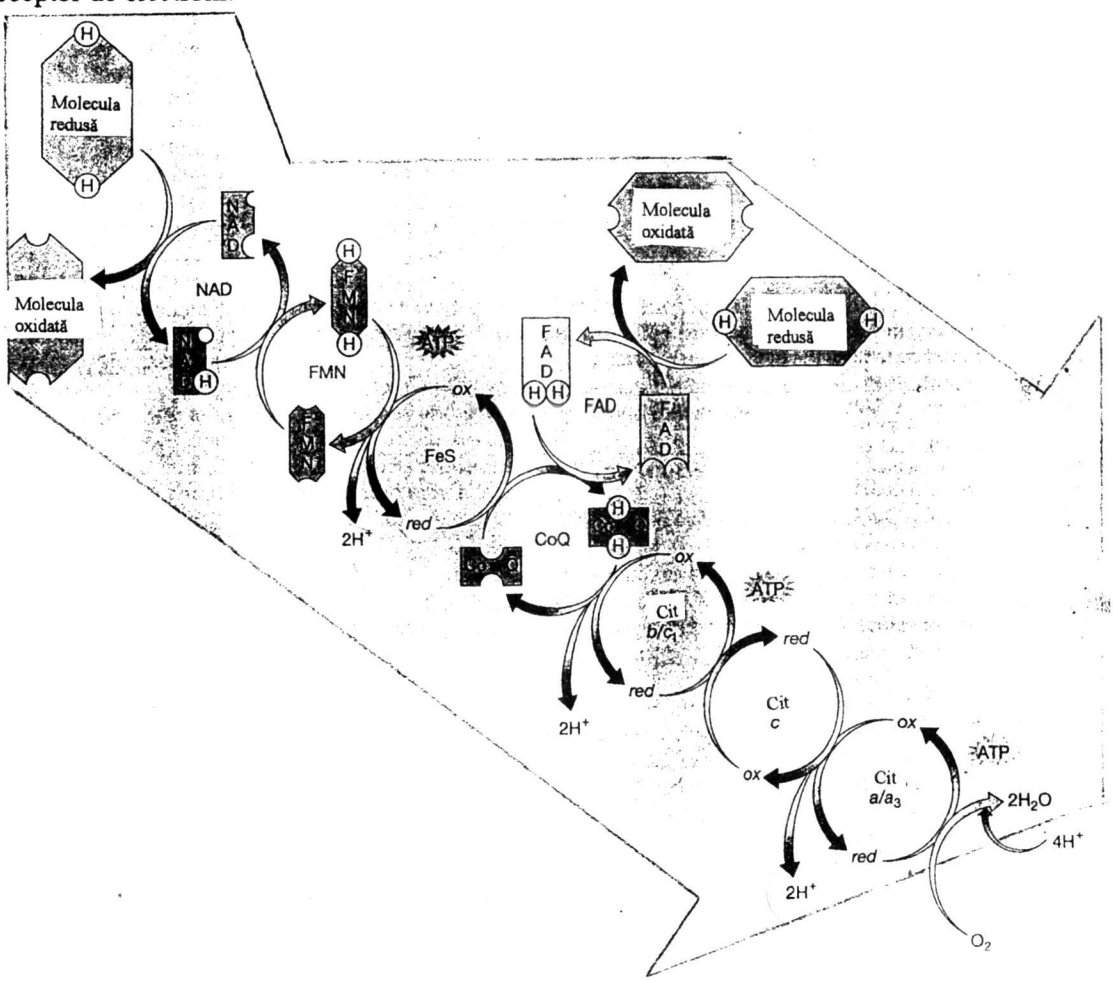


Fig. 55. Catena transportoare de electroni. Transportorii sunt: NAD, FMN (un derivat al vitaminei B_2), o proteină cu Fe şi S, coenzima Q şi citocromii *a, b* şi *c*. Fiecare component al catenei se reduce şi se oxidează succesiv. La capătul catenei, electronii sunt acceptaţi de O_2, pentru a forma H_2O. FAD deversează electronii în aval faţă de NAD. Datorită distribuţiei diferiţilor transportori în membrana celulară a procariotelor sau în membrana mitocondrială internă a eucariotelor şi pentru că unii transportori acceptă numai protoni (H^+), iar alţii numai electroni, protonii sunt pompaţi din citoplasmă, în mediul extracelular (sau din matricea mitocondrială, în spaţiul dintre cele două membrane) în timp ce electronii sunt transportaţi pe catenă. Gradientul protonic este utilizat pentru sinteza ATP.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Substratul energetic poate fi organic sau anorganic: H_2, NH_3, nitriţii, sulful elementar şi compuşii săi reduşi, compuşii Fe.

Setul de reacţii de importanţă esenţială în respiraţia aerobă este ciclul Krebs. Protonii (H^+) cedaţi de diferiţi intermediari ai ciclului Krebs ajung, prin sistemele redox ale catenei de respiraţie, la O_2. Trăsătura distinctivă a procesului respirator este prezenţa enzimelor care alcătuiesc *catena transportoare de electroni*.

Catena de respiraţie aerobă este constituită din proteine ce poartă grupe prostetice redox, care funcţionează ca transportori de electroni (*citocromii*) sau ca enzime oxido-reductaze (*dehidrogenazele*).

Electronii eliberaţi din substrat, străbat componentele catenei, până la acceptorul final de electroni. Concomitent se sintetizează ATP. Ansamblul reacţiilor de oxidare şi de fosforilare se numesc *fosforilări oxidative*.

Se disting trei tipuri de proteine redox:

- proteine ferice simple, nehemice;
- feredoxine
- proteine cu fier hemic.

Feredoxinele sunt proteine care conţin o grupare prostetică alcătuită din atomi de Fe nehemic, de S acidolabil, care formează aglomerări dimerice $(Fe\text{-}S)_2$ sau mai frecvent tetramerice $(Fe\text{-}S)_4$, legaţi de resturile de cisteină ale unei proteine. În unele proteine, atomii de Fe sau Fe-S sunt conectaţi la un grup hemic (de exemplu, al citocromilor) sau de o flavină (flavoproteina cu FAD sau cu FMN) sau la un atom de Mo (în dehidrogenaze şi nitrat-reductaze).

Toate aceste proteine sunt situate în membrana citoplasmatică a celulei bacteriene. Unele sunt agregate în grupări funcţionale complexe.

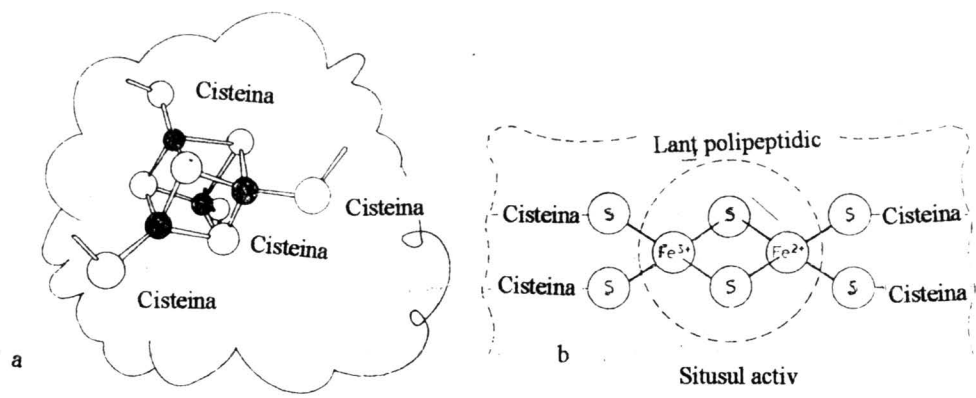


Fig. 56 Feredoxina. a. Structura spaţială a complexului FeS. Cercurile pline reprezintă atomii de Fe, iar cele goale, atomii de S. b. Structura spaţială a grupării FeS cu reprezentarea schematică a situsului activ (după Hall şi Rao, 1977).

Componentele catenei respiratorii bacteriene

Catena respiratorie bacteriană poate fi împărţită în trei segmente funcţionale, ale căror potenţiale redox cresc de la flavoproteine, până la citocrom-oxidaza terminală.

Intrarea protonilor (H^+) în catena respiratorie are loc la nivelul primului segment funcţional care conţine NAD-dehidrogenaza, asociată cu o flavoproteină şi cu feredoxina.

Coenzima redusă (NADH), formată prin oxidarea glucozei este reoxidată şi H^+ este transferat la grupul prostetic al flavoproteinelor (FMN). În funcţie de substratul oxidat, există o varietate de dehidrogenaze.

Al II-lea segment funcţional este constituit dintr-o familie de molecule chinonice liposolubile, denumite *lipoquinone sau coenzime Q*. Coenzimele Q sunt adevăratele navete transportoare de electroni, între flavoproteinele reduse (FMNH) şi citocromii oxidaţi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Al III-lea segment funcţional al lanţului respirator este format din *citocromi*, componente care transferă numai electroni. Ei conţin un grup prostetic format din protoporfirină, în centrul căreia se găseşte un atom de Fe. Gruparea prostetică se numeşte *hem*, dacă Fe este în stare redusă (Fe^{2+}) sau *hemină*, dacă Fe este oxidat (Fe^{3+}).

Nu se cunosc toate proteinele componente ale citocromilor. Ele sunt desemnate prin litere, urmate de un indice sau prin cifre, care indică lungimea de undă a spectrului lor maxim de absorbţie.

Citocromul terminal, care are rolul unei enzime finale acceptoare de electroni, se numeşte *citocrom-oxidază*. Este singura proteină capabilă să transfere electronii la O_2 molecular, după reacţia:

$$O_2 + 4\,e^- + 4\,H^+ \xrightarrow{\text{Citocrom-oxidaza}} 2\,H_2O$$

Reacţiile de oxido-reducere a componentelor catenei transportoare îndeplinesc două funcţii:

- acceptă electronii de la un donor şi îi transferă unui acceptor;
- conservă o parte din energie în procesele de *fosforilare oxidativă*.

Cantitatea mare de energie produsă în respiraţie, rezultă din transferul electronilor prin catena transportoare, de la un component cu nivel redox mai crescut, la altul cu nivel redox mai scăzut. Energia este captată în legături macroergice, prin combinarea Pi cu ADP şi formarea ATP.

Fosforilările oxidative au loc concomitent cu transferul protonilor(H^+) între NADH-dehidrogenază şi flavoproteină, la joncţiunea CoQ/citocrom şi la joncţiunea citocrom-oxidază/O_2.

Unele componente ale catenei de respiraţie – flavoproteinele şi quinonele – acceptă numai protoni(H^+), iar citocromii acceptă numai electroni.

În prezenţa O_2, setul de enzime al catenei de respiraţie este abundent la bacteriile strict aerobe şi la cele facultativ anaerobe, când cresc în condiţii de aerobioză.

Numeroase bacterii heterotrofe (chimioorganotrofe) realizează un metabolism aerob. Ele oxidează substraturi organice, acceptorul final de electroni fiind O_2: *M. tuberculosis*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* etc.

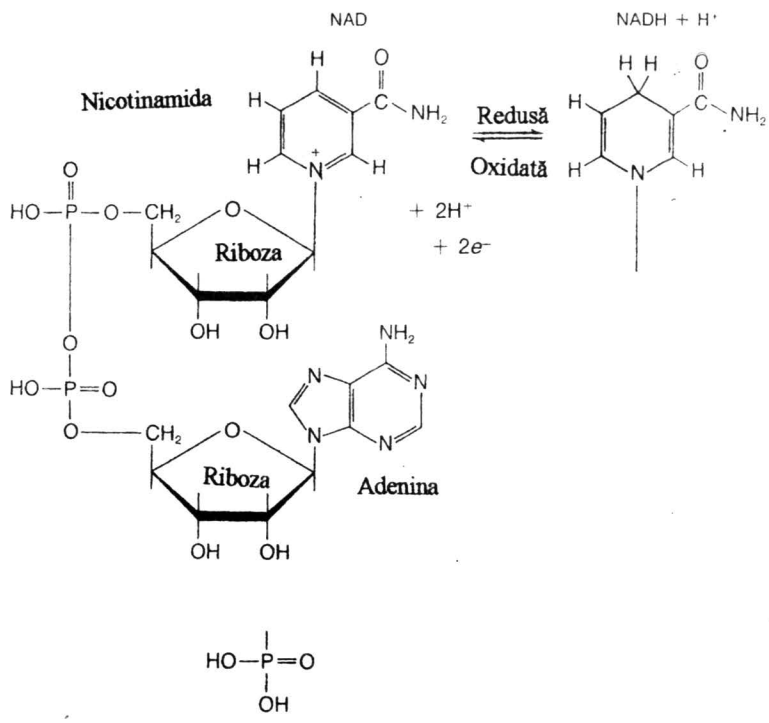


Fig. 57. Structura coenzimei NAD^+ şi $NADP^+$.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

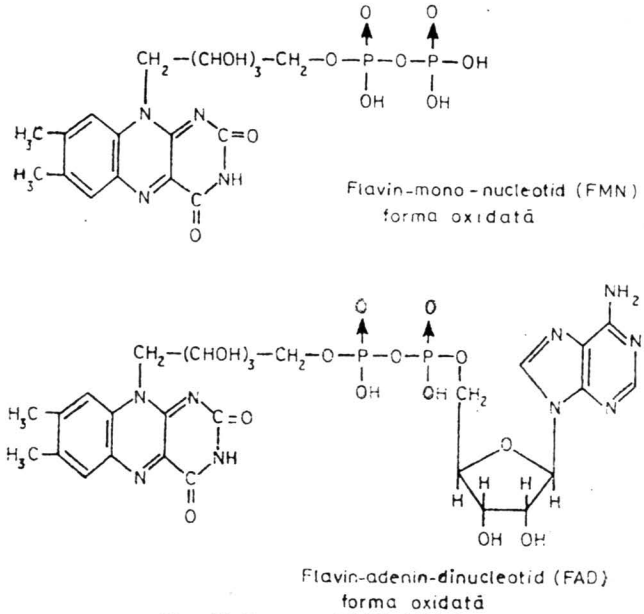


Fig. 58. Structura FMN și FAD.

Ciclul Krebs

Ciclul Krebs este inițiat prin condensarea acetil-CoA cu oxaloacetatul, pentru a forma *acidul citric*. Intr-o succesiune de reacții ciclice, se produce oxidarea aerobă a grupării acetil, care provine nu numai din glicoliză sau din șuntul hexozo-monofosfatului, ci și din β-oxidarea acizilor grași, ca și din degradarea catenei de carbon a majorității aminoacizilor. Ciclul Krebs furnizează compușii care inițiază căile de biosinteză.

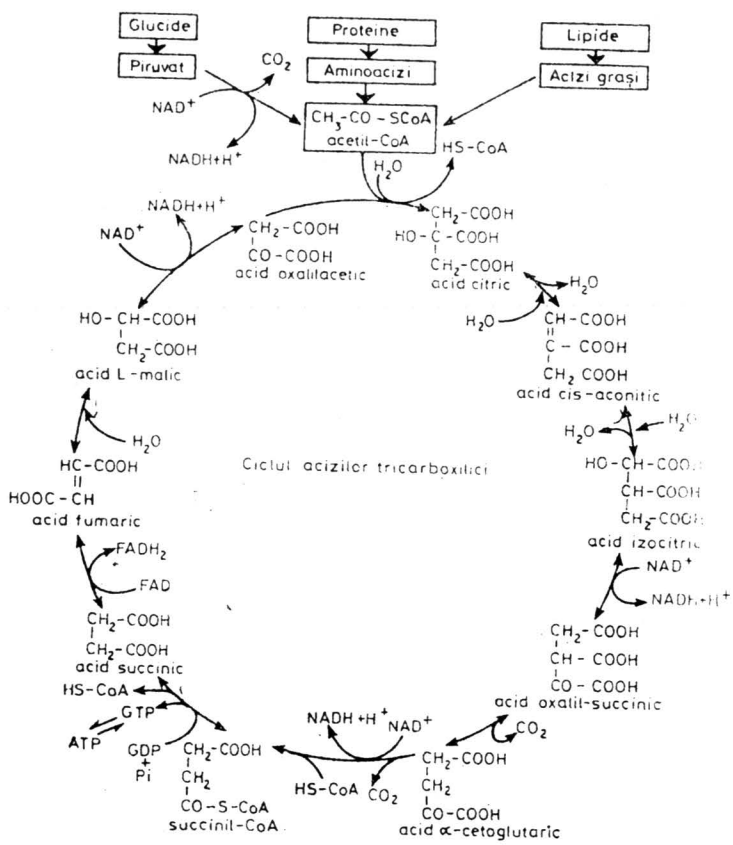


Fig. 59. Reacțiile ciclului acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fiecare tur al ciclului, pornind de la acetil-CoA, eliberează două molecule de CO_2 şi 8 H^+, sub forma a două molecule de NADH + H^+, una de NADPH + H^+ şi una de $FADH_2$.

Experienţele pe preparatele mitocondriale, denotă că în timpul transportului unei perechi de electroni între NAD şi O_2, se sintetizează 3 molecule de ATP. Randamentul energetic global al oxidării unei molecule de glucoză prin glicoliză şi prin ciclul Krebs, este de 38 molecule ATP.

La bacterii, numărul real de molecule de ATP sintetizate nu este cunoscut, datorită prezenţei ATP-azei. Determinările indirecte sugerează un bilanţ identic, dar măsurătorile directe evidenţiază 16 molecule ATP/o moleculă de glucoză.

Mecanisme de conservare a energiei

Funcţia chimică esenţială a proceselor metabolice producătoare de energie este aceea de a furniza compuşi organici cu legături chimice cu conţinut energetic ridicat. Metaboliţii fosforilaţi acumulează o cantitate liberă de energie, cuprinsă între 14,8 kcal/mol pentru fosfoenol-piruvat şi 2,3 kcal/mol pentru glicerol-fosfat.

Molecula cea mai importantă cu rol de transportor de energie este ATP, cu un conţinut de energie liberă de 8 kcal/mol pentru fiecare legătură fosfat. ATP realizează un transfer de energie între moleculele cu conţinut ridicat de energie liberă şi cele care participă la reacţiile consumatoare de energie. În aceiaşi categorie intră nucleotidele piridinice: NAD, NADP, FAD.

Reacţiile de fosforilare în cursul cărora sunt sintetizate molecule cu conţinut energetic ridicat şi în special ATP, prezintă un interes special pentru metabolismul energetic bacterian.

Valoarea energetică a unei căi metabolice se estimează după numărul de molecule de ATP sintetizate prin oxidarea unei molecule de substrat (de exemplu, glucoză).

Reacţiile de fosforilare sunt de două feluri şi au sedii celulare distincte:

- reacţii de *fosforilare la nivelul substratului*, catalizate de enzime citoplasmatice;
- reacţii de fosforilare oxidativă, catalizate de enzimele localizate la nivelul membranei citoplasmatice şi a invaginărilor sale.

Diversele căi metabolice care furnizează energie prezintă trei compartimente distincte interdependente:

- compartimentul reacţiilor de oxidare a substratului energetic;
- compartimentul căii de transfer a electronilor şi a protonilor, care se eliberează în reacţiile de oxidare, pentru reducerea acceptorului final de electroni;
- compartimentul sintezei de metaboliţi fosforilaţi cu conţinut ridicat de energie.

Sinteza ATP dependentă de gradientul protonic

Electronii atomilor de H, eliberaţi prin reacţiile de oxidare a substratului în ciclul Krebs sunt transferaţi prin sistemele de transport şi generează legături macroergice de ATP.

Conversia ADP la ATP este catalizată de *ATP-sintaza* (sau ATP-aza), într-un proces denumit *chemiosmoză* (Mitchell, 1961). Procesul este rezultatul unei serii de reacţii chimice care se produce în şi pe cele două feţe ale unei membrane.

Chemiosmoza are loc atât în membrana celulei procariote, cât şi la nivelul membranei interne a mitocondriilor celulei eucariote.

Unele componente ale catenei de respiraţie (citocromii), transferă numai electroni. Pe măsură ce electronii sunt transferaţi în catena de respiraţie, protonii sunt pompaţi pe faţa externă a membranei, astfel încât concentraţia ionică devine mai mare pe faţa externă a membranei, decât pe faţa internă. Scăderea concentraţiei protonilor pe faţa internă a membranei determină revenirea protonilor în celulă şi respectiv în matricea mitocondriei, tinzând să egaleze concentraţia lor pe ambele feţe ale membranei.

Gradientul de concentraţie protonică pe cele două feţe ale membranei, generează un gradient electrochimic, care face ca membrana să devină o baterie biologică, care produce ATP.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Excesul de H^+ pe faţa externă a membranei, îi conferă acesteia o sarcină netă pozitivă în raport cu faţa internă. Gradientul de potenţial reducător dintre cele două feţe ale membranei se numeşte *forţă proton-motrice*.

Protonii se reîntorc în celulă prin canale speciale ale ATP-sintazei. Potenţialul reducător este utilizat de enzimă în reacţia: ADP + Pi → ATP.

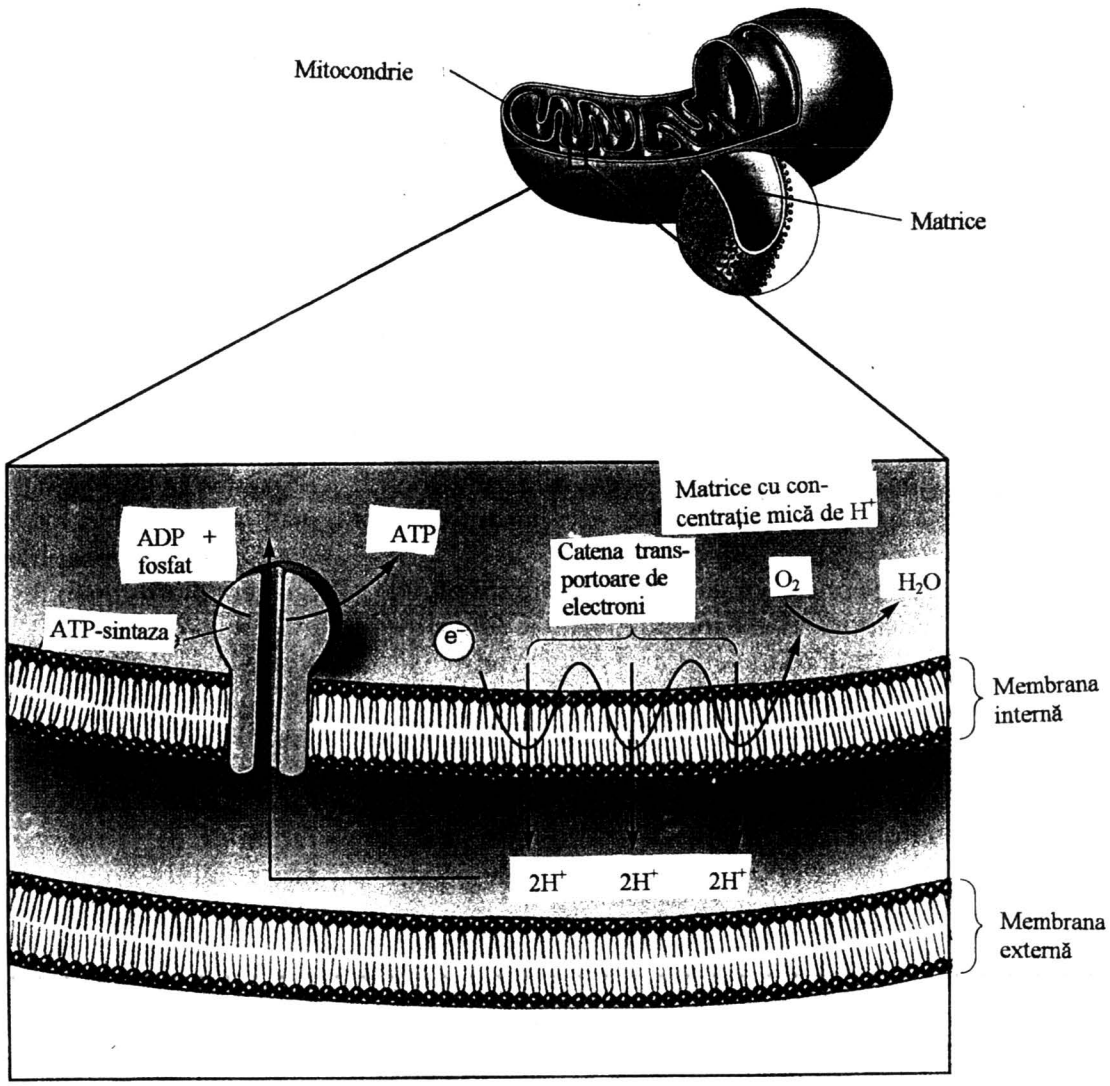


Fig. 60. Captarea energiei prin mecanismul chemiosmotic în mitocondrie. Protonii „pompaţi" din matrice, pe măsură ce electronii sunt transportaţi, trec din nou în interior prin canalele moleculare ale ATP-sintetazei. Ele fosforilează ADP şi formează ATP. Fluxul protonilor este sursa de energie a acestei reacţii (după Black, 1996).

Mecanisme moleculare protectoare care permit respiraţia aerobă

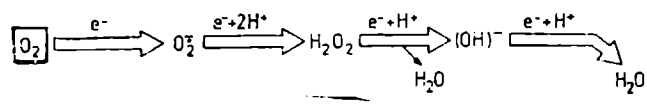
O_2 poate avea rolul de acceptor de electroni, nu numai la capătul catenei respiratorii membranare, ci şi în alte reacţii de oxidare a substratului, catalizate de enzimele solubile în citoplasmă. Aceste reacţii pot fi fiziologice, producătoare sau neproducătoare de energie sau sunt nefiziologice şi în anumite condiţii sunt letale. În consecinţă, celula bacteriană este supusă permanent unui *stress oxidativ*, care, funcţional, se poate defini ca ca un exces de oxidanţi în mediul celular, deoarece în anumite condiţii, rata producerii intermediarilor reducerii parţiale a O_2, depăşeşte capacitatea celulei de a-i elimina.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În citoplasmă se găsesc enzime capabile să transfere electronii de la substratul pe care-l oxidează, la O_2 molecular. Majoritatea acestor enzime sunt flavoproteine cu Fe şi uneori cu Mo. Substraturile oxidate sunt fie coenzime reduse (NADH-oxidaza, NADPH-oxidaza), fie molecule organice oxidate de flavoproteine.

Prin reducerea O_2 se formează aşa numitele *specii reactive ale* O_2, ce apar ca produse secundare ale metabolismului aerob normal, după schema redată în fig. 61.

Fig. 61. Reducerea completă a unei molecule de O_2 la apă, necesită 4 electroni. În acest proces se formează compuşi intermediari (radicalul anionic superoxid (O^-_2), peroxidul de H(H_2O_2) şi radicalul hidroxil (OH^-). Ionul O^-_2 este eliminat de superoxid dismutaze (SOD), iar H_2O_2 este îndepărtată de catalaze şi peroxidaze.



$$O_2^- + O_2^- + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{superoxid dismutază}} H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaze}} 2\,H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + RH_2 \xrightarrow{\text{peroxidaze}} 2\,H_2O + R$$

Intermediarii reducerii O_2 reacţionează cu toţi constituienţii celulari şi produc leziuni ale mleculelor de ADN, ARN, proteine, iar prin peroxidarea lipidelor apar leziuni membranare.

Toate organismele şi-au dezvoltat *mecanisme protectoare* pentru a atenua efectele oxidanţilor. Mecanismele de apărare a celulei faţă de stressul oxidativ sunt de două categorii: *preventive şi reparatorii.*

Mecanismele preventive faţă de stressul oxidativ, acţionează prompt şi previn apariţia leziunilor oxidative, prin distrugerea derivaţilor reactivi ai O_2 sau limitează durata acţiunii unor reacţii, ca de exemplu, *peroxidarea lipidelor.*

Peroxidul de H (H_2O_2) rezultă prin transferul a doi electroni, la o moleculă de O_2, catalizat de NADH-oxidază, după reacţia:

$$NADH + H^+ + O_2 + 2\,e^- \rightarrow NAD^+ + H_2O_2$$

H_2O_2 are o toxicitate moderată şi este îndepărtată, cel mai adesea sub acţiunea *catalazei* (o proteină cu Fe porfirinic), prin conversia la H_2O şi O_2, sau a peroxidazelor, care o reduc la H_2O, după reacţia:

$$2\,H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

Catalaza este o enzimă neinductibilă. Este produsă abundent de bacteriile aerobe şi de cele facultativ aerobe. Cele microaerofile produc cantităţi mici de catalază. Enzima nu este produsă de bacteriile strict anaerobe şi nici de cele anaerobe aerotolerante. Unele bacterii lactice sintetizează totuşi o catalază adevărată, dacă în mediu se găseşte *hemina*, deoarece ele nu sintetizează grupul prostetic hem al catalazei.

Peroxidazele sunt flavoproteine fără metale grele şi catalizează dehidrogenarea unui substrat (AH_2), în prezenţa H_2O_2. Cea mai importantă este NADH-peroxidaza:

$$NADH + H^+ + H_2O_2 \rightarrow NAD^+ + 2\,H_2O.$$

Ionul O_2^- *(superoxid)* se formează în cantităţi mici în timpul procesului respirator normal. Este foarte reactiv şi produce distrugerea oxidativă a lipidelor şi a altor componente biochimice ale celulei. Are durata de acţiune cea mai lungă dintre toţi intermediarii reducerii O_2 şi acţiunea sa distructivă se poate produce succesiv, asupra mai multor molecule. Ionul superoxid este eliminat sub acţiunea superoxid-dismutazelor (SOD), care catalizează conversia sa la H_2O_2 şi O_2, după reacţia:

$$2\,O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \text{ sau } O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Ionul superoxid este eliminat rapid şi nu se acumulează în celulă. SOD se găseşte în toate celulele aerobe. Majoritatea bacteriilor anaerobe aerotolerante, inclusiv bacteriile lactice au SOD, dar nu au catalază. La bacteriile facultativ-anaerobe (*E. coli*), nivelul general al SOD creşte după expunerea la O_2. Singurele organisme care nu au enzime protectoare în echipamentul lor sunt bacteriile anaerobe stricte. De aceea, O_2 exercită efecte toxice letale asupra lor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Radicalul hidroxil liber ($OH^{\cdot}$) este cel mai reactiv dintre intermediarii reducerii O_2. Este cel mai puternic agent oxidant. Efectele acţiunii sale oxidante se manifestă asupra tuturor categoriilor de molecule organice din celulă. Se formează ca rezultat al acţiunii radiaţiei ionizante. Este probabil, unul dintre agenţii moleculari care omoară celulele după iradiere X sau gama.

Oxigenul singlet ($^1O_2$) este o formă moleculară cu energie superioară şi se formează când cei doi electroni pereche dobândesc spini antiparaleli, fie că se află pe acelaşi orbital, fie pe orbite diferite. În această formă, O_2 nu primeşte un electron suplimentar, ci numai o energie suplimentară, care schimbă spinul unuia dintre electroni.

Oxigenul singlet este un poluant atmosferic. Poate fi produs fie spontan, fie prin sisteme enzimatice. Cea mai comună cale biochimică a producerii sale este reacţia O_2 cu lumina vizibilă. Procesul implică prezenţa unei molecule a unei substanţe colorate care absoarbe lumina.

Oxigenul singlet se generează prin acţiunea lactoperoxidazei şi mieloperoxidazei, prezente în lapte, salivă şi în fagocite. În fagocite, oxigenul singlet are rolul de a omorî agentul fagocitat. În prezenţa oxigenului singlet, se produc reacţii de oxidare, al căror rezultat este distrugerea oxidativă a componentelor celulare vitale, ca de exemplu, fosfolipidele membranei celulare.

Mecanismele reparatorii acţionează tardiv şi repară leziunile cauzate de molecule reactive care nu au fost anihilate de sistemele de apărare preventivă. Fiecare condiţie de stress induce sinteza unui set de proteine, unic pentru categoria agentului inductor al stressului. Unele proteine induse de stressul oxidativ sunt comune şi pentru alte tipuri de stress (stressul hipertermic, înfometarea etc.).

Stressul oxidativ alterează numeroase căi metabolice. Gradul de alterare este dependent de capacitatea de răspuns al celulei la stress. Eliminarea timpurie a stressului oxidativ, prin mecanismele preventive este esenţială pentru supravieţuirea celulei.

Respiraţia anaerobă

Majoritatea organismelor capabile de respiraţie anaerobă sunt procariote. Transformările chimice pe care le realizează în timpul generării energiei, în absenţa O_2 au o deosebită importanţă ecologică sau industrială.

În absenţa O_2, bacteriile facultativ-anaerobe îşi obţin energia din substratul energetic, fie prin *respiraţia anaerobă*, fie prin *fermentaţie*. Respiraţia anaerobă este mai eficientă din punct de vedere energetic, comparativ cu fermentaţia.

În procesul respiraţiei anaerobe, electronii cedaţi de substratul organic oxidabil sunt preluaţi de catena de respiraţie celulară şi transferaţi unui acceptor final, care este fie un *compus oxigenat* (*nitrat, sulfat, carbonat*), fie unui singur compus organic (*fumaratul*). Transferul electronilor de-a lungul catenei respiratorii este cuplat cu fosforilările oxidative membranare.

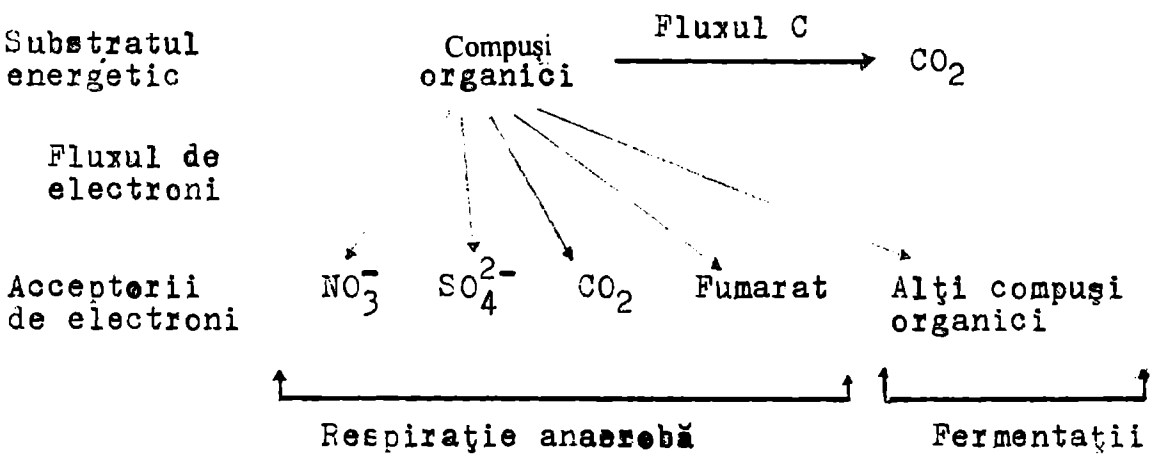


Fig. 62. Acceptorii finali de electroni în respiraţia anaerobă şi în fermentaţii. Catabolismul compuşilor organici produce CO_2.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Respiraţia nitraţilor

Unele bacterii realizează reducerea dezasimilatorie a nitraţilor la nitriţi, iar altele reduc atât nitraţii la nitriţi, precum şi nitriţii la oxizi de azot şi ulterior până la N_2. Procesul fiziologic al reducerii nitraţilor la N_2, se numeşte *denitrificare* şi are loc atât în mediile naturale cât şi în *vitro*. Nitratul, nitritul şi respectiv oxizii de azot au rolul de acceptori de electroni, care derivă din oxidarea unor compuşi organici, pentru producerea energiei.

La *E. coli*, în condiţii de anaerobioză, sistemul enzimatic al reducerii nitratului este *inductibil*. În prezenţa lactatului (substrat nefermentabil) ca sursă de carbon şi energie şi a nitratului este indusă sinteza *nitrat-reductazei* (NAR), o enzimă ce conţine Mo. De aceea, procesul denitrificării este strict anaerob. Reducerea nitratului are loc după reacţia:

$$NO_3^- + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{NAR(A)}} NO_2^- + H_2O$$

Reacţia este dezasimilatorie, deoarece *nitraţii sunt reduşi la nitriţi*, care, în cazul *E. coli* se acumulează în mediu şi au un efect toxic, inhibitor pentru creştere, nitritul nefiind o sursă de azot asimilabil. Reducerea dezasimilatorie, limitată, a nitratului la nitrit, poartă numele de *respiraţia nitratului*.

La unele bacterii denitrificatoare, în procesul respiraţiei anaerobe a nitraţilor, este indus tot setul de enzime reducătoare, astfel încât reducerea nitraţilor este totală, până la N_2, în următoarele etape:

$$2\,HNO_3 \xrightarrow{1} 2\,HNO_2 \xrightarrow{2} 2\,NOH \xrightarrow{3} \underset{\text{Acid hiponitros}}{N_2O} \xrightarrow{4} \underset{\text{Oxid nitros}}{N_2}$$

Reacţia (1) este catalizată de NAR(A), treapta a II-a, de nitrit-reductază, iar reacţiile 3 şi 4, de enzime necunoscute.

Fiecare treaptă de reducere este cuplată cu sinteza ATP. Unele procariote catalizează numai o parte a căii reducerii nitraţilor. Calea incompletă este utilizată în două situaţii: 1) când bacteriile posedă echipamentul enzimatic necesar celor 4 trepte, dar în mediu se găsesc numai intermediari mai reduşi decât nitratul; 2) când bacteriile au incapacităţi genetice de a cataliza una sau alta din treptele reducerii.

În funcţie de incapacităţile genetice de sinteză, variantele biochimice ale denitrificării sunt următoarele:

1) organisme capabile să reducă nitratul la nitrit, cărora le lipsesc enzimele pentru treptele 2, 3, 4;

2) organisme capabile să reducă nitratul până la N_2O(oxid nitros), cărora le lipseşte enzima pentru catalizarea treptei a IV-a;

3) organisme capabile să reducă nitritul, dar nu şi nitratul, la N_2, însă nu au capacitatea de a cataliza reacţia treptei 1;

4) organisme capabile să reducă nitratul la nitrit şi oxidul nitric la N_2O, cărora le lipsesc enzimele ce catalizează reacţiile 2 şi 4.

Majoritatea bacteriilor aparţin primei categorii. Activitatea lor nu este însoţită de producerea N_2 (gazos). Ele nu sunt *denitrificatoare*.

Bacteriile care nu au capacităţi fermentative, dar reduc nitratul cresc în anaerobioză, într-un mediu cu NO_3^- şi glucoză.

În procesul respiraţiei anaerobe, oxidarea substratului energetic este completă, ceea ce implică funcţionarea ciclului Krebs, ca şi în respiraţia aerobă. Oxidarea completă a unei molecule de glucoză are loc după următoarele reacţii globale:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O + 12\,NAD^+ \rightarrow 6\,CO_2 + 12\,NADH + H^+$$
$$12\,NADH + H^+ + 12\,NO_3^- \rightarrow 12\,NAD^+ + 12\,NO_2^- + 12\,H_2O$$

Pentru o moleculă de glucoză oxidată se sintetizează 24 molecule de ATP, mult mai mult decât în fermentaţie, dar mai puţin decât în oxidarea aerobă. Oxidarea substratului organic

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

în condiţiile respiraţiei anaerobe a nitratului, este completă, singurul produs final fiind CO_2. De aceea, bacteriile strict anaerobe, în prezenţa nitratului au un randament superior de creştere, în raport cu creşterea în condiţii fermentative.

Funcţia respiratorie a NAR (A) permite bacteriilor să crească în anaerobioză în prezenţa nitratului şi a unei surse oxidabile, dar nefermentabilă, de energie. Intr-un mediu fără substrat fermentabil şi fără nitrat, *E. coli* creşte numai în anaerobioză.

Unele bacterii reduc nitratul numai în condiţiile în care, din mediu lipseşte substratul care în mod obişnuit, are rolul de acceptor de electroni: *Shigella, Salmonella, Escherichia, Proteus, Brucella, Clostridium.* În mediu se acumulează nitriţi toxici care limitează creşterea. Alte bacterii sunt "specializate" pentru reducerea dezasimilatorie a NO_3^- şi a NO_2^-, până la NO sau N_2O, care ulterior sunt reduşi la N_2: *Pseudomonas, Alcaligenes* etc.

Cel mai adesea, bacteriile nitrat-reducătoare sunt heterotrofe şi în prezenţa O_2 sunt aerobe. Ele preferă respiraţia aerobă, deoarece au catenă respiratorie. Catena funcţionează şi în anaerobioză, dar la capătul ei, acceptorul final de electroni este nitratul.

Nitrat-reductazele dezasimilatorii sunt proteine legate de membrană. În prezenţa O_2, sinteza lor este represată, dar este *indusă* în condiţii anaerobe.

Reducerea dezasimilatorie a NO_3^- este limitată la bacterii, dar cele care catalizează acest proces sunt foarte diverse sub raport fiziologic.

Reducerea nitratului este o modalitate de respiraţie şi pentru bacteriile care oxidează H_2. Oxidarea H_2 este cuplată cu reducerea NO_3^-, până la N_2.

Bacteriile sulfoxidante (*Thiobacillus*) oxidează sulful elementar, oxidare cuplată deasemenea cu reducerea NO_3^- la N_2, după următoarea reacţie globală:

$$5\,S + 6\,NO_3^- + 2\,H_2O \rightarrow 5\,SO_4^{2-} + 3\,N_2 + 4\,H^+$$

Importanţa practică. Bacteriile denitrificatoare sunt foarte răspândite în mediile naturale. Procesul denitrificării este foarte important, deoarece constituie una din treptele circuitului azotului în natură (astfel se formează aproape tot azotul atmosferic), dar are efect negativ, deoarece diminuă randamentul productiv al fertilizatorilor cu azot, obţinuţi pe cale industrială. Astfel se pierde 5-8o% din cantitatea de fertilizatori cu azot.

Bacteriile denitrificatoare realizează scăderea concentraţiei compuşilor azotaţi din staţiile de epurare, înlăturând pericolul eutrofizării bazinelor în care se deversează apele uzate.

Denitrificarea este calea prin care, compuşii cu azot, levigaţi din sol şi transportaţi în oceanul planetar, sunt reciclaţi la N_2 atmosferic, acesta devenind din nou disponibil proceselor biologice prin fixare.

Unul din produsele reacţiei de denitrificare – oxidul nitros (N_2O) – difuzează spre stratosferă, unde, într-o reacţie fotochimică este convertit la oxid nitric (NO). NO reacţionează cu O_3, rezultatul fiind distrugerea barierei majore de ozon care protejează organismele vii de radiaţia UV.

Reducerea asimilatorie a nitraţilor

Cele mai multe bacterii, dar şi fungii, algele şi plantele superioare au activitate nitrat-reductazică NAR(A), cu funcţie *asimilatorie*, adică enzima reduce nitratul la NH_4^+. Reducerea nitraţilor la nitriţi este urmată de o serie de reacţii de reducere, consumatoare de energie, al căror rezultat final este formarea NH_4:

$$NO_3^- \xrightarrow{NAR(A)} NO_2^- \longrightarrow \underset{\text{Acid hiponitros}}{HON} \longrightarrow \underset{\text{Hidroxilamina}}{NH_2OH} \longrightarrow NH_4OH$$

Reducerea asimilatorie a nitratului nu este producătoare, ci consumatoare de energie.

Nitrat-reductaza asimilatorie este o proteină citoplasmatică ("solubilă"). În prezenţa NH_4, sinteza ei este represată. La fiecare treaptă a reacţiei are loc transferul a doi electroni. Treptele reacţiei reducerii asimilatorii au loc în condiţii de aerobioză.

NH_4 este sursa de azot asimilabil pentru toate bacteriile chimioorganotrofe.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reducerea asimilatorie şi cea dezasimilatorie a NO_3^- (denitrificarea), nu par a fi procese fiziologice corelate în mod obligatoriu. Unele bacterii catalizează ambele tipuri de reacţii. Altele fac numai reacţiile reducerii dezasimilatorii ale NO_3 şi nu pot să-l asimileze, iar o altă categorie asimilează NO_3, dar nu fac reacţia de denitrificare. La organismele capabile să catalizeze ambele tipuri de reacţii, distincţia dintre cele două procese se face prin expunerea culturii la O_2. De exemplu, *P. aeruginosa* poate asimila NO_3 în prezenta sau în absenţa O_2, dar denitrificarea are loc numai în condiţii de anaerobioză.

Respiraţia sulfatului

În contrast cu alte bacterii şi cu plantele, care necesită cantităţi mici de sulfat pentru sinteza constituienţilor celulari cu sulf (prin reacţiile de reducere asimilatorie a sulfatului), unele bacterii posedă echipamentul enzimatic care catalizează *reducerea dezasimilatorie a sulfatului.*

Sulfatul este cel mai oxidat compus al sulfului şi este, totodată, anionul major în apa mării. Sulfatul are rol de *acceptor final* de electroni în procesul oxidării anaerobe a unor compuşi organici de către organismele unui grup fiziologic specializat, al *bacteriilor sulfat-reducătoare.* Produsul final al reducerii sulfatului este H_2S, care se poate acumula în cantităţi mari în mediile naturale.

Bacteriile sulfat-reducatoare sunt strict anaerobe şi oxidează diferite substraturi organice: lactat, piruvat, etanol, malat, acetat etc., dar şi H_2. Substraturile organice sunt oxidate la *acetat,* deoarece bacteriile sulfat-reducatoare (*Desulfovibrio, Desulfotomaculum)* nu au echipamentul enzimatic al ciclului acizilor tricarboxilici.

Reducerea dezasimilatorie a sulfatului este un *proces respirator obligatoriu* şi nu o cale alternativă a respiraţiei, aşa cum este denitrificarea. Sulfatul este redus la H_2S, după următoarea reacţie;

$$SO_4^{2-} + 8\,e^- + 8\,H^+ \rightarrow S^{2-} + 4\,H_2O$$

Capacitatea de a utiliza SO_4^{2-} ca acceptor de electroni în procesul generării energiei, este restrânsă la grupul special al bacteriilor sulfat-reducătoare, strict anaerobe. Ele reprezintă una din formele vechi de viaţă ale planetei şi participă la producerea şi transformarea depozitelor minerale în natură.

Alţi compuşi oxidaţi ai sulfului (sulfitul, tiosulfatul, tetrationatul) pot fi utilizaţi ca acceptori de electroni şi sunt reduşi la H_2S, în procese dezasimilatorii. Reducerea lor este catalizată nu numai de bacteriile sulfat-reducătoare, ci şi de alte grupe fiziologice.

Bacteriile sulfat-reducătoare constituie un ansamblu fiziologic şi ecologic de tipuri morfologice diferite de bacterii anaerobe, care au în comun capacitatea de a activa sulfatul şi de a-l reduce la H_2S.

Reducerea bacteriană a sulfatului, este un proces important pentru mineralizarea materiei organice în mediile anoxice, în special în sistemele marine (cu salinitate de 1-4%, în care cresc *Desulfovibrio, Desulfobacter, Desulfococcus*) şi în mediile hipersaline.

Reducerea asimilatorie a sulfatului. Bacteriile şi organismele superioare (plante şi animale) preiau sulful necesar din sulfat. Sulful are numărul de oxidare –2 în compuşii organici şi +6 în SO_4^{2-}, o reducere de $8e^-$. Asimilarea sulfului implică reducerea SO_4^{2-} la H_2S, înainte de încorporarea sa în compuşii organici. Aceiaşi reacţie de reducere, are loc în procesul fiziologic al respiraţiei anaerobe a SO_4^{2-}, dar mecanismele enzimatice sunt diferite. Reducerea SO_4^{2-} pentru a fi folosit ca sursă de H_2S se numeşte *reducerea asimilatorie a sulfatului.* SO_4^{2-} este activat de ATP. ATP-sulfurilaza catalizează legarea ionului SO_4^{2-}, de un fosfat al ATP şi rezultă *adenozin-fosfo-sulfatul* (APS). O altă grupare fosfat este adaugată la APS şi se formează *fosfo-adenozin-fosfo-sulfatul* (PAPS), după care ionul SO_4^{2-} este redus. Ca şi în reducerea dezasimilatorie, primul produs al reducerii SO_4^{2-}, este sulfitul ($S_2O_3^{2-}$). În reacţiile de reducere asimilatorie a SO_4^{2-}, H_2S format este convertit la sulf organic, iar în cele de reducere dezasimilatorie, H_2S este excretat.

H_2S este încorporat în substratul organic, ca atom de S al cisteinei. La bacterii, substratul organic acceptor al S este O-acetilserina, după reacţia:

O-acetilserină + H_2S → Cisteină + Acid acetic + H_2O.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Respiraţia fumaratului

În procesul respiraţiei anaerobe, rolul de acceptor final de electroni, îl au nu numai compuşii anorganici (nitraţi, nitriţi, sulfatul), ci şi *fumaratul*, un compus organic.

În respiraţia fumaratului, transferul de electroni se face, ca şi în procesul respiraţiei aerobe, pe calea unei dehidrogenaze, a unei lipoquinone, unul sau mai mulţi citocromi *b şi* a unei *fumarat-reductaze* (o feredoxină), legată covalent cu grupul prostetic FAD. Fumarat-reductaza catalizează următoarea reacţie:

$$^{-}OOC - CH = CH - COO^{-} + FADH_2 \rightarrow {}^{-}OOC - CH_2 - CH_2 - COO^{-}$$

Fumarat Succinat

Fumarat-reductaza oxidează NADH, lactatul, formiatul, glicerolul. Sursele de fumarat ale celulei sunt multiple: fumaratul se formează din malat, aspartat, piruvat. Reducerea unei molecule de fumarat produce o moleculă de ATP. *E. coli* creşte într-un amestec de H_2 sau formiat şi fumarat, ca sursă de carbon şi energie.

Respiraţia carbonatului(Reducerea respiratorie a CO_2)

Carbonatul (CO_2 sau HCO_3^-) este unul din cei mai abundenţi anioni anorganici în natură. CO_2 este produsul metabolismului organismelor heterotrofe. Apa mării este o soluţie de carbonat, tamponată cu diferite săruri.

Unele bacterii folosesc CO_2 ca acceptor de electroni în respiraţia anaerobă. Dintre bacteriile care reduc CO_2, cele mai importante sunt *metanogenele*. Donorul de electroni este H_2. Metanogenele cresc în condiţii de chimiolitotrofie, într-un mediu mineral şi o atmosferă gazoasă formată din amestec de CO_2 şi H_2. CO_2 nu este fixat pe calea reductivă a ciclului Calvin, ci printr-un alt set de reacţii specifice grupului. Metanogenele sunt frecvente în mediile naturale, deoarece în reacţia de reducere a carbonatului, se eliberează o cantitate relativ mare de energie:

$$4\ H_2 + 2\ H^+ + HCO_3^- \rightarrow CH_4 + 3\ H_2O.$$

Alte bacterii care reduc CO_2, sunt *acetogenele*. Ele produc *acetat* din CO_2 şi H_2, după reacţia: $4\ H_2 + 2H^+ + 2\ HCO_3^- \rightarrow CH_3COOH + 4\ H_2O$.

Acetatul este produs de *Clostridium aceticum , Acetobacter woodii.*

Când cresc într-un mediu care conţine o atmosferă formată din amestecul de H_2 şi O_2, atât metanogenele cât şi acetogenele sunt chimiolitotrofe şi sunt strict anaerobe. Ambele grupe se dezvoltă şi ca heterotrofe pe medii organice.

Fermentaţia

Fermentaţia este un proces catabolic producător de energie în absenţa O_2, în care compuşii organici au rolul de donori şi de acceptori de electroni. Compuşii chimici care îndeplinesc aceste funcţii sunt, deobicei, metaboliţi derivaţi dintr-un substrat fermentabil(de exemplu, un glucid).

Studiul ştiinţific al fermentaţiilor a fost iniţiat de L. Pasteur. În perioada 1857-1875, el a demonstrat că procesele de transformare biochimică sunt consecinţa "vieţii fără aer" a unor microorganisme, cu rolul de fermenţi. Denumirea de "fermentaţie" vine de la latinescul *fervere*, care înseamnă "a fierbe" şi semnifică degajarea, uneori abundentă, a CO_2 în timpul fermentaţiei ceea ce îi conferă aspectul de "fierbere".

Pe baza cunoştiinţelor actuale, fermentaţia poate fi definită ca un ansamblu de reacţii biochimice aerobe de oxidare şi de reducere, care furnizează celulei energia necesară prin mecanismul *fosforilărilor la nivelul substratului*, reacţii ce au loc în citoplasmă. Funcţia energetică majoră sau unică a fermentaţiei este producerea ATP. ATP rezultă prin transferul grupelor fosfat, din intermediarii fosforilaţi cu energie înaltă, ce se formează în timpul degradării substratului.

Fermentaţiile se desfăşoară în condiţii anaerobe. La microorganismele strict anaerobe şi la cele aerobe facultativ-anaerobe, în prezenţa O_2, căile fermentative sunt represate. Cele strict anaerobe nu se dezvoltă, iar cele facultativ-anaerobe îşi schimbă calea metabolică de producere a energiei, de la fermentaţie la respiraţie. Numai bacteriile lactice constituie o excepţie: O_2 nu modifică modul lor de a produce energie, astfel încât fermentaţia continuă chiar în prezenţa O_2. Efectul inhibitor al O_2 asupra fermentaţiei, la microorganismele facultativ anaerobe, ar fi datorat inactivării uneia din enzimele cheie ale căii Embden-Meyerhof, *fosfofructokinaza.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La microorganismele aerobe-facultativ anaerobe, inhibiţia fermentaţiei în aerobioză, poartă denumirea de "efect Pasteur" şi se manifestă prin diminuarea netă a produselor de fermentaţie, precum şi a consumului de substrat pentru producerea unei cantităţi echivalente de masă celulară. Randamentul de creştere pentru aceiaşi cantitate de substrat consumat, este mult mai mare în condiţii de aerobioză decât în anaerobioză.

Substraturile fermentabile sunt compuşi organici diverşi: glucide sau compuşi înrudiţi (acizi organici, alcooli), aminoacizi, amine, purine, pirimidine. În procesul fermentaţiei, anumiţi compuşi organici, de obicei doi metaboliţi diferiţi, derivaţi dintr-un substrat fermentabil au rolul de *donor* şi respectiv, de *acceptor de electroni*.

În cursul fermentaţiei este menţinut echilibrul *redox*: nivelul mediu de oxidare a produselor finale este egal cu al produsului fermentabil.

În fermentaţie se produce o degradare *incompletă* a substratului şi de aceea se eliberează o cantitate mult mai mică de energie decât în procesul de respiraţie, în cursul căreia oxidarea substratului este completă.

Procesele de fermentaţie sunt iniţiate de *fosforilări la nivelul substratului*. Rezultatul lor este sinteza ATP, dar şi a altor compuşi cu o legătură bogată în energie, cel mai important fiind *acetil-CoA*.

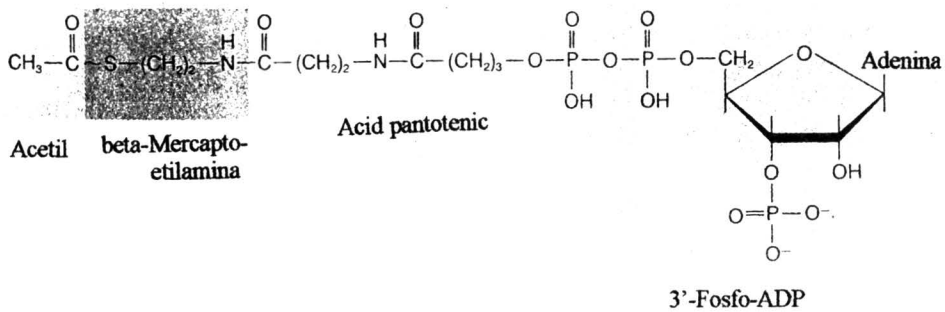


Fig. 63. Structura moleculară a acetil-CoA.

Fermentaţia glucidelor

Glucidele sunt cele mai importante substraturi fermentabile. Sunt fermentate polizaharide (amidonul, celuloza, pectina, chitina), dizaharide (lactoza, maltoza, zaharoza), hexoze (glucoza, fructoza, galactoza), pentoze (arabinoza, xiloza), acizi derivaţi din zaharuri (acidul gluconic şi glucuronic), polialcooli (manitol, glicerol).

Glucoza este fermentată, virtual, de toate bacteriile anaerobe. Fermentaţia diferitelor glucide are loc în una sau în câteva etape *specifice*, urmate de o etapă *nespecifică*. În etapa nespecifică intervin o parte din enzimele implicate în fermentaţia glucozei.

Fermentaţia glucozei este cel mai cunoscut proces fermentativ şi este iniţiat printr-o reacţie de fosforilare, în urma căreia rezultă *glucozo-6 fosfatul*. Procesul poate fi considerat că decurge în două etape:

- în prima etapă se desfăşoară reacţiile de oxidare a glucozei. Rezultatul lor este formarea intermediarului central al metabolismului fermentativ al glucidelor – *acidul piruvic*. Acest compus este mai oxidat decât glucoza şi diferenţa de potenţial redox este stocată în piridin-nucleotidele reduse;
- în etapa a II-a au loc reacţii de reducere a compuşilor intermediari, prin care se formează mai multe produse finale.

Glucoza este oxidată pe una din următoarele 4 căi: calea Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP, denumită şi calea hexozo-difosfatului sau a glicolizei); calea hexozo-monofosfatului (HMP, denumită şi calea pentozo-fosfatului); calea fosfocetolazei; calea Entner-Doudoroff.

Calea EMP este calea majoră de degradare a glucozei, la cele mai multe organisme, precum şi în celulele vegetale şi animale. Este o cale integral anaerobă. Ea cuprinde o secvenţă de 10 reacţii enzimatice, prin care o moleculă de glucoză este degradată la două molecule de piruvat, fără participarea O_2 molecular.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Glucoza este fosforilată la glucozo-6 fosfat, în cursul procesului de transport membranar, sau intracelular, sub acţiunea unei kinaze citoplasmatice, cu consum de ATP. Glucozo-6 fosfatul este izomerizat la fructozo-6 fosfat, iar acesta, sub acţiunea *fosfofructokinazei* este convertit la *fructozo-1,6 difosfat.*

Reacţia caracteristică a căii EMP este scindarea fructozo-1,6 difosfatului, catalizată de aldolază, ceea ce justifică denumirea de calea *hexozo-difosfatului.*

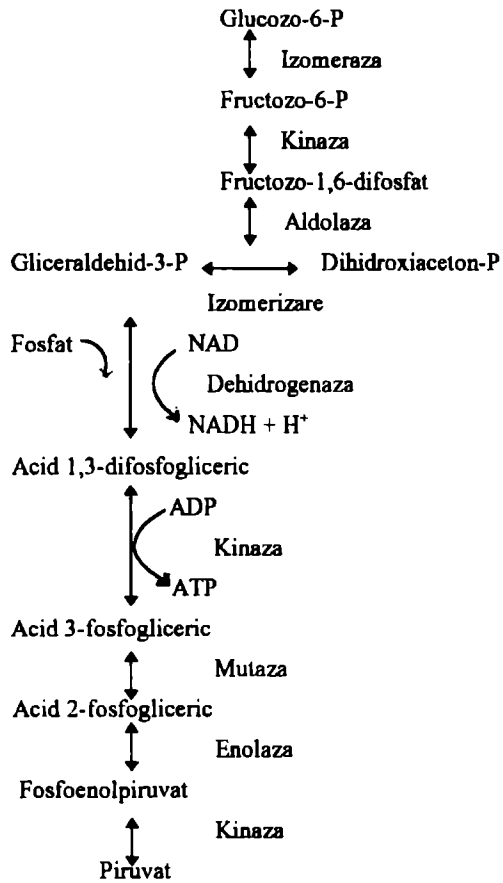
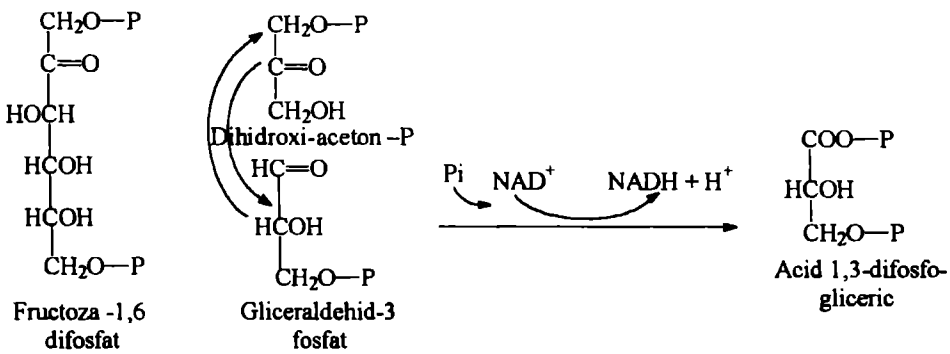


Fig. 64. Calea Embden-Meyerhoff-Parnas (calea glicolizei), de degradare a glucozei la piruvat.

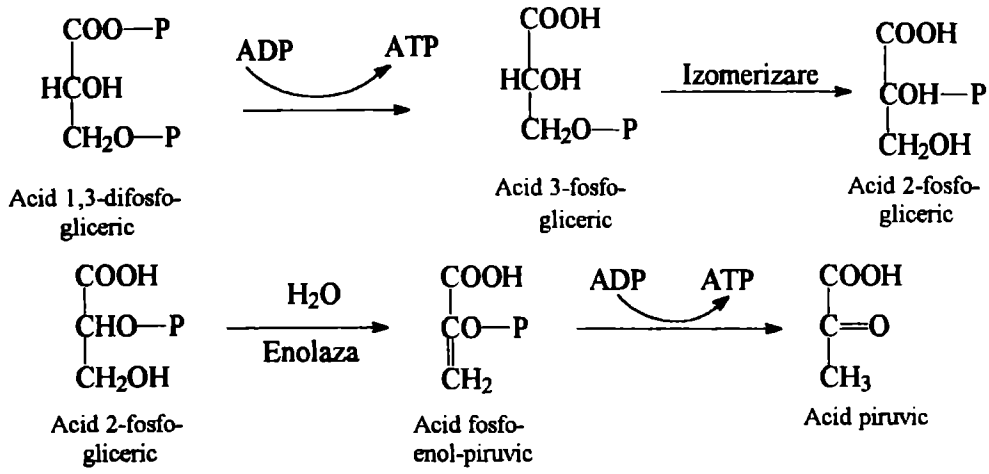
Fructozo-1,6 difosfatul este scindat sub acţiunea aldolazei şi rezultă un amestec de triozo-fosfaţi (aldehida-3 fosfoglicerică şi dihidroxiaceton-1 fosfat). Triozo-fosfaţii sunt oxidaţi, cu reducerea NAD^+ şi se formează două molecule de acid 1,3 difosfogliceric. Printr-o serie de reacţii, acidul 1,3 difosfogliceric este convertit la piruvat:



Reacţia de clivare a fructozo-1,6 difosfatului şi formarea acidului 1,3-difosfogliceric. Se esterifică fosfatul anorganic şi se reduce NAD^+.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Oxidarea grupării HC = O la –COOH este exergonică şi se sintetizează ATP:



Conversia celor două molecule de acid 1,3-difosfogliceric la două molecule de acid piruvic şi regenerarea ATP.

Calea EMP nu explică modul în care pentozele pot fi folosite ca sursă de energie şi nici formarea ribozei, necesară biosintezei acizilor nucleici.

Piruvatul este intermediarul oxidat cel mai frecvent al diferitelor căi catabolice. Uneori se formează acetil-CoA.

Reacţiile de reducere a compusului oxidat intermediar (piruvatul) conduc la formarea diferitelor produse finale, fie unice, fie în amestec, pe baza cărora se diferenţiază bacteriile fermentative. În cazul în care rezultă un amestec de produse finale, acestea au grade diferite de oxidare, de la CO_2 până la alcool (mai redus decât glucoza), trecând prin nivele intermediare de oxidare a cetonelor şi aldehidelor.

Produsele finale ale fermentaţiei nu pot fi degradate în anaerobioză. Proporţia lor în amestec influenţează în mod direct valoarea pH a mediului la sfârşitul procesului. Analiza cantitativă a produselor finale ale unei fermentaţii este utilă pentru caracterizarea unor grupe taxonomice.

Fosforilările în condiţii de anaerobioză sunt puţin numeroase, deoarece se produc în reacţiile de dehidrogenare a substratului, neexistând catena de respiraţie. De exemplu, în fermentaţia glucozei, fosforilarea are loc în două etape:

- prin oxidarea gliceraldehid-3 P, sub acţiunea NAD;
- prin conversia fosfoenol-piruvatului la piruvat.

Reacţiile de reducere a intermediarilor oxidaţi la produse finale (de exemplu, reducerea piruvatului la lactat) nu produc energie. Unele reacţii de reducere sunt chiar consumatoare de ATP (de exemplu, formarea acidului succinic). Astfel, prin glicoliza unei molecule de glucoză se sintetizează 4 molecule de ATP, iar randamentul energetic net este de 2 molecule de ATP. Producerea limitată de energie în procesele fermentative explică randamentul totdeauna inferior al creşterii în anaerobioză, comparativ cu acela al procesului respirator.

Fermentaţia lactică

Fermentaţia lactică este procesul biologic prin care microorganismele catabolizează glucoza din mediu şi o transformă în acid lactic. În cantitate mică, acidul lactic este produsul de catabolism al unui număr mare de microorganisme, dar unele bacterii furnizează acidul lactic, ca produs principal al metabolizării glucidelor.

Bacteriile lactice se împart în două categorii:

a) bacteriile *homofermentative* produc numai acid lactic ca produs final al procesului fermentativ: *Lactobacillus delbrueckii, L. bulgaricus. L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, Streptococcus lactis, S. cremoris, S. thermophilus*;

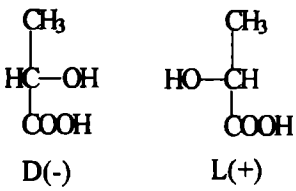
b) bacteriile *heterofermentative* produc, pe lângă acid lactic, cantităţi mari ale altor produse finale (CO_2, etanol, acid acetic, glicerină, manită, în funcţie de specie): *L. brevis, L. lycopersici, Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, L. citrovorum.*

Cantităţi mari de acid lactic sunt produse de unele mucegaiuri (*Rhizopus*), dar pentru producerea industrială a acidului lactic se folosesc bacteriile lactice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Bacteriile lactice sunt Gram pozitive, nesporulate, anaerobe-aerotolerante sau microaerofile, mobile, nepatogene şi cresc în mediu acid.

Acidul lactic (alfa-hidroxipropionic) conţine un atom de carbon asimetric şi de aceea poate exista sub două forme optic active: izomerii D(-) şi L (+):



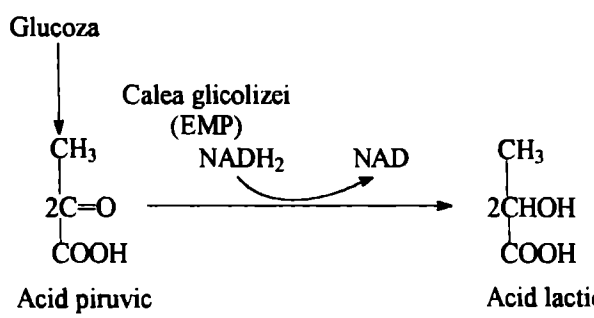
Lactat-dehidrogenaza este stereospecifică. Izomerul rezultat din fermentaţie depinde de natura dehidrogenazei lactice. Bacteriile homofermentative şi mucegaiul *Rhizopus oryzae* conţin L-lactat-dehidrogenaza şi produc lactat (L+). Cele heterofermentative conţin D-lactat-dehidrogenază şi formează acid D(-) lactic. Bacteriile lactice produc acid lactic optic inactiv, adică amestecul racemic al formelor D(-) şi L(+). Racemizarea se datorează acţiunii enzimei *racemaza*, existentă la majoritatea bacteriilor lactice. Activitatea racemazei depinde de concentraţia de acid nicotinic din mediu, un factor de creştere esenţial pentru bacteriile lactice. În general, bacteriile lactice necesită prezenţa în mediu, a vitaminelor grupului B şi a unor aminoacizi, care au rolul de factori de creştere.

Diferenţele dintre bacteriile homofermentative şi heterofermentative sunt determinate de prezenţa sau de absenţa *aldolazei*, enzima cu rol esenţial în glicoliză. Bacteriile homofermentative au *aldolază* şi clivează hexozodifosfatul la triozofosfaţi, iar în echipamentul enzimatic al celor heterofermentative, aldolaza lipseşte.

Din punct de vedere biochimic, fermentaţia lactică este cea mai simplă: piruvatul, furnizat pe calea EMP este redus direct, fără decarboxilare, sub acţiunea NAD^+ - lactat-dehidrogenazei, la *lactat*.

În acest proces fermentativ, acidul lactic este produsul final unic sau dominant cantitativ. În funcţie de proporţia produselor finale ale fermentaţiei, se disting trei tipuri de microorganisme:

a) Microorganisme *homofermentative* (lactobacili, streptococi, unii fungi, unele protozoare). Acidul lactic este produsul unic al fermentaţiei. Dintr-un mol de glucoză se formează doi moli de lactat. Acelaşi set de reacţii are loc în celula musculară, în condiţii de hipoxie:

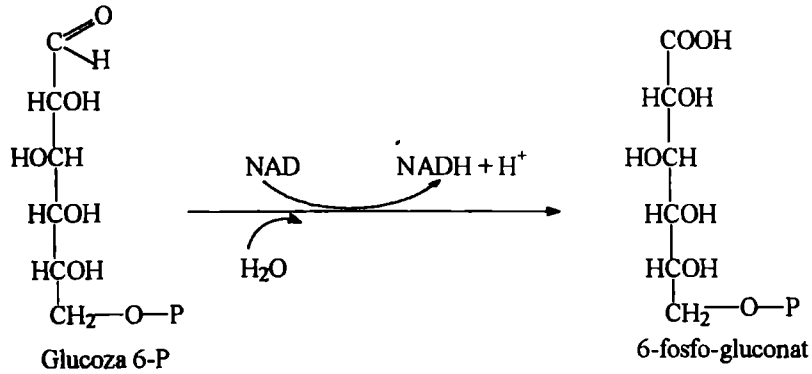


b) Microorganisme *heterofermentative* (unele specii de *Lactobacillus, Peptococcus*) realizează o fermentaţie heterolactică. Procesul începe pe calea *hexozo-monofosfatului*(HMP) şi se continuă pe *calea fosfocetolazei*.

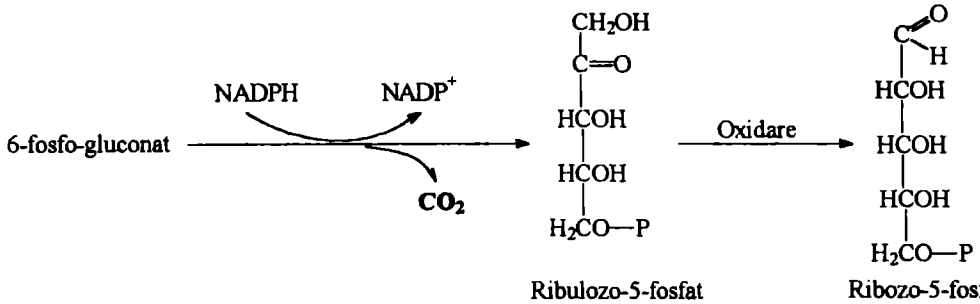
Calea HMP este o variantă a căii glicolitice, activă la unele bacterii, pentru utilizarea hexozelor, pentozelor şi a altor glucide. Este o cale de "ocolire" a căii glicolitice şi de aceea se mai numeşte "şuntul HMP" sau calea pentozo-fosfatului, calea fosfogluconatului sau calea Warburg-Dickens-Horecker. Această cale furnizează unităţi pentozice, care sunt convertite la intermediari ai căii glicolitice şi la acid piruvic.

Prima reacţie a şuntului HMP este fosforilarea glucozei, ca şi în calea glicolizei. Glucozo-6 fosfatul este oxidat la *acid-6 fosfogluconic*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Acidul fosfogluconic este decarboxilat la ribulozo-5-fosfat:



Ribozo-5 fosfatul este utilizat pentru sinteza acizilor nucleici, pentru glicoliză etc.

Calea *fosfocetolazei* este o cale fermentativă restrânsă la bacteriile heterolactice. Este o variantă a căii hexozo-monofosfatului, cu care are în comun primele trei reacţii ce conduc la formarea ribulozo-5 fosfatului. Acesta este izomerizat la xilulozo-5 fosfat. *Fosfocetolaza*, enzima caracteristică a căii, clivează xilulozo-5 fosfatul, la aldehida-3 fosfoglicerică şi acetil fosfat.

Aldehida-3 fosfoglicerică este metabolizată pe calea EMP, până la piruvat şi în final la *lactat*, iar acetil-fosfatul este redus în două trepte succesive, la *etanol*.

În fermentaţia heterolactică se formează cantităţi echimolare de CO_2, etanol şi lactat.

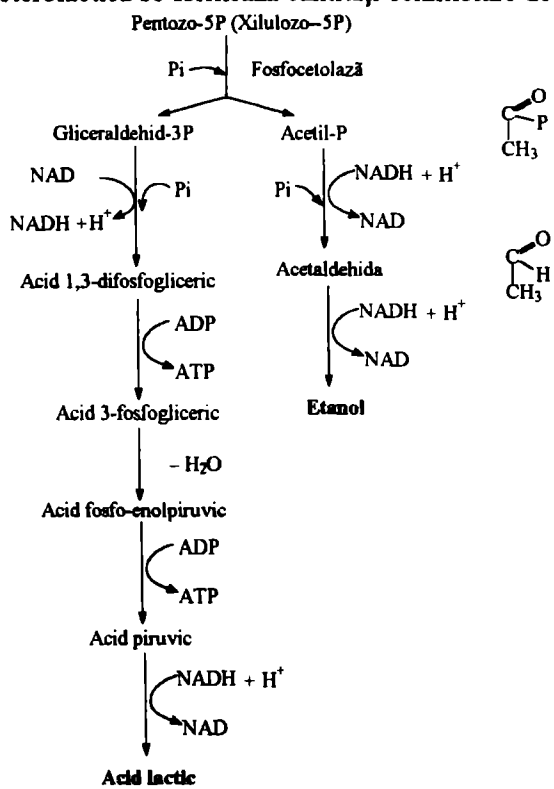


Fig. 65. Fermentaţia heterolactică bacteriană pe calea fosfocetolazei. Produsele finite sunt CO_2, etanolul şi acidul lactic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Etanolul se formează din acetil-fosfat, prin două reduceri succesive care echilibrează cele două oxidări ce au loc în reacţia de conversie a glucozo-6 P la pentozo-P şi CO_2. Produsele finale ale fermentaţiei sunt *etanolul, lactatul şi* CO_2.

c) Microorganisme *aceto-lactice*. Bacteriile din g. *Bifidobacterium*, într-o fermentaţie mixtă aceto-lactică, produc un amestec de acizi lactic şi acetic, după reacţia:

2 Glucoză → 3 Acid acetic + 2 Acid lactic

Glucoza este fosforilată şi convertită la fructozo-6 fosfat, ca şi în calea glicolitică EMP. Fructozo-6 fosfatul este clivat într-o reacţie de fosforilare cu fosfat anorganic, într-o moleculă de acetil-fosfat şi eritrozo-4 fosfat. Reacţia eritrozo-4 fosfatului cu o moleculă de fructozo-6 fosfat, iniţiază o serie complexă de rearanjări moleculare, din care rezultă gliceraldehid-3 fosfat şi acetil-fosfat:

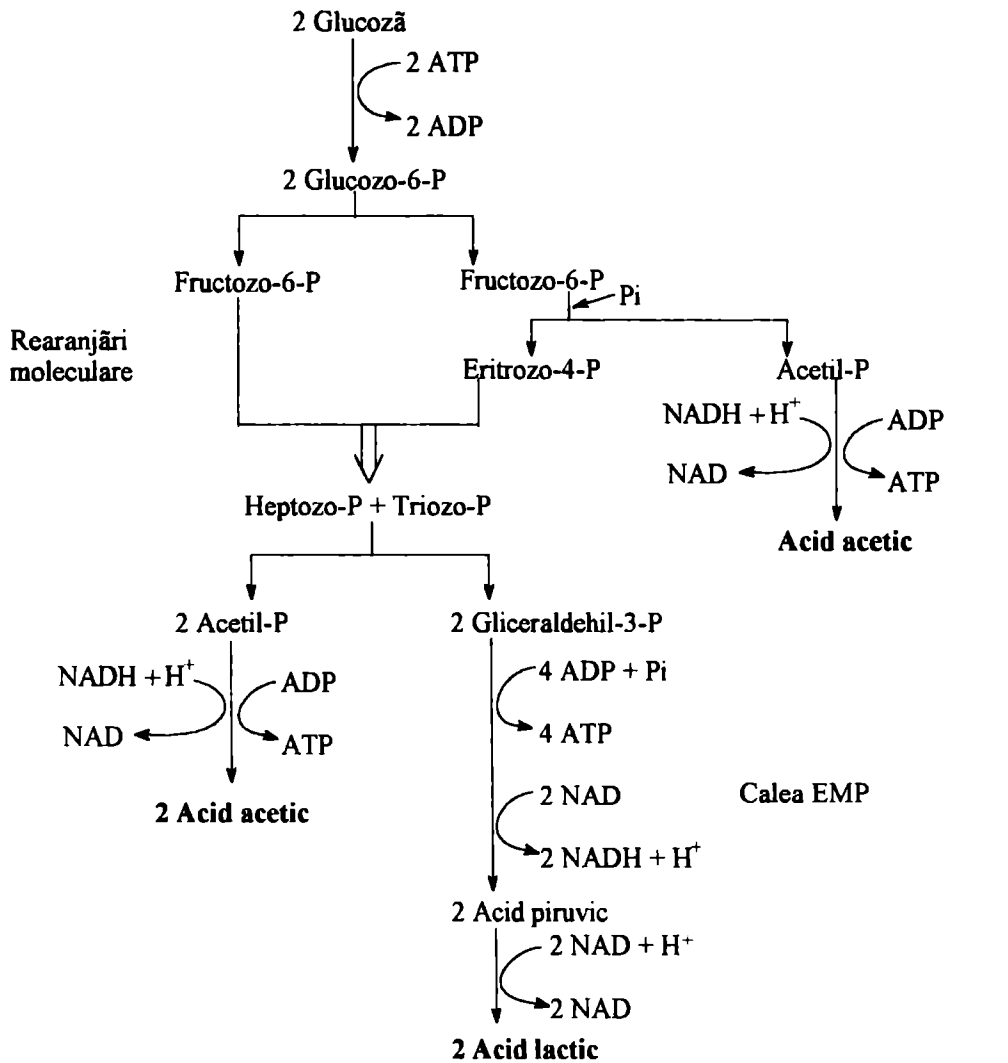


Fig. 66. Fermentaţia glucozei de către *Bifidobacterium*. Din două molecule de glucoză, rezultă 3 molecule de acid acetic şi două de acid lactic.

Fermentaţia alcoolică produsă de levuri

Fermentaţia alcoolică este foarte asemănătoare celei lactice, diferenţa fiind numai cu privire la transformările acidului piruvic. Cea mai mare parte a etanolului produs în natură şi în industrie, rezultă prin catabolizarea anaerobă a glucozei şi a altor zaharuri de către *Saccharomyces cerevisiae*.

Levurile catabolizează glucoza pe calea EMP. Dintr-o moleculă de glucoză se formează două molecule de *piruvat*, care nu este convertit la acetil-CoA, ca în metabolismul aerob şi nici

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

redus la acid lactic, ci sub acţiunea *piruvat-decarboxilazei*, o enzimă cheie în fermentaţia alcoolică, este decarboxilat la *acetaldehidă*. Acetaldehida este redusă de NAD-reductază, la *etanol*.

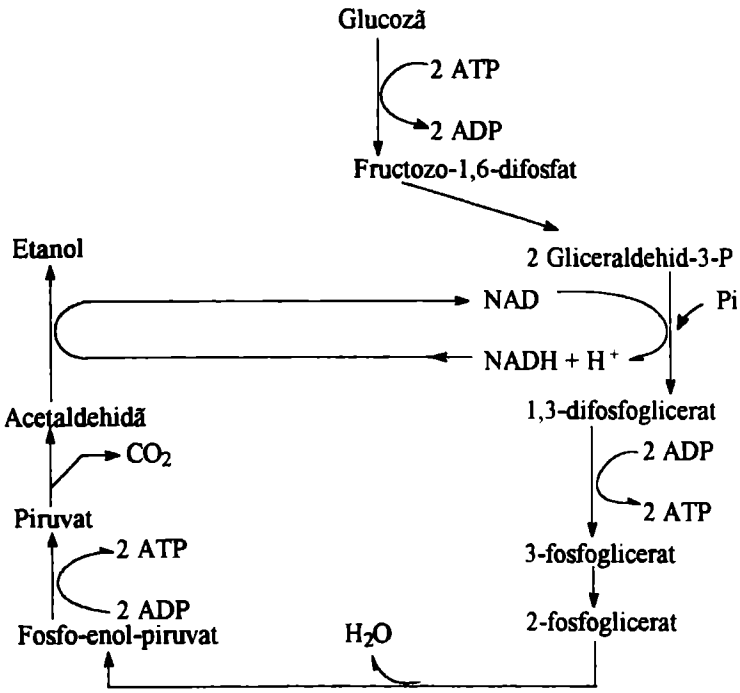


Fig. 67. Fermentaţia glucozei la etanol şi CO_2 de către levuri.

Producţia netă de ATP în fermentaţia alcoolică este de două molecule, pentru fiecare moleculă de glucoză, mult mai puţin decât în catabolizarea aerobă.

Prin transferul celulelor în condiţii anaerobe, rata degradării glucozei se intensifică de 3-4 ori. Transferul invers este însoţit de diminuarea ratei de catabolizare a glucozei şi oprirea fermentaţiei alcoolice. Fenomenul poartă denumirea de "efect Pasteur".

Fermentaţia alcoolică bacteriană

O altă cale a fermentaţiei alcoolice este aceea care se desfăşoară în celulele bacteriene saprobionte anaerobe, aerotolerante, ce aparţin g. *Zymomonas*. Glucoza este catabolizată pe calea Entner-Doudoroff (ED).

Calea ED a fost descoperită la *Pseudomonas saccharophila* şi la *Zymomonas mobilis*, dar este funcţională şi la unii viermi paraziţi.

Primul intermediar al căii este *glucozo-6 P*, care este oxidat, ca şi pe calea HMP, la *6-fosfo-gluconat*.

Prin reacţia de dehidrogenare, 6-fosfo-gluconatul formează un compus intermediar – *2-ceto-3-dezoxi-6-fosfo-gluconatul*, care este scindat sub acţiunea *aldolazei, la piruvat şi aldehida-3-fosfoglicerică*.

Aldehida-3-fosfoglicerică poate fi catabolizată de enzimele căii EMP şi rezultă piruvat sau de enzimele căii HMP şi se formează precursori pentru biosinteza ADN, ARN, a vitaminelor, a aminoacizilor aromatici etc. Calea funcţionează şi la *Rhizobium*. Lipseşte la bacteriile Gram pozitive, cu excepţia unora din g. *Nocardia*.

Bacteriile din g. *Zymomonas* metabolizează piruvatul prin decarboxilare, deoarece au o enzimă rară la bacterii – *piruvat-decarboxilaza*. Pe această cale, dintr-o moleculă de glucoză se formează două molecule de *etanol* şi două molecule de CO_2.

Multe bacterii lactice, enterobacterii şi clostridii formează cantităţi mari de piruvat în procesul fermentaţiei, dar nu au piruvat-decarboxilază pentru producerea acetaldehidei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

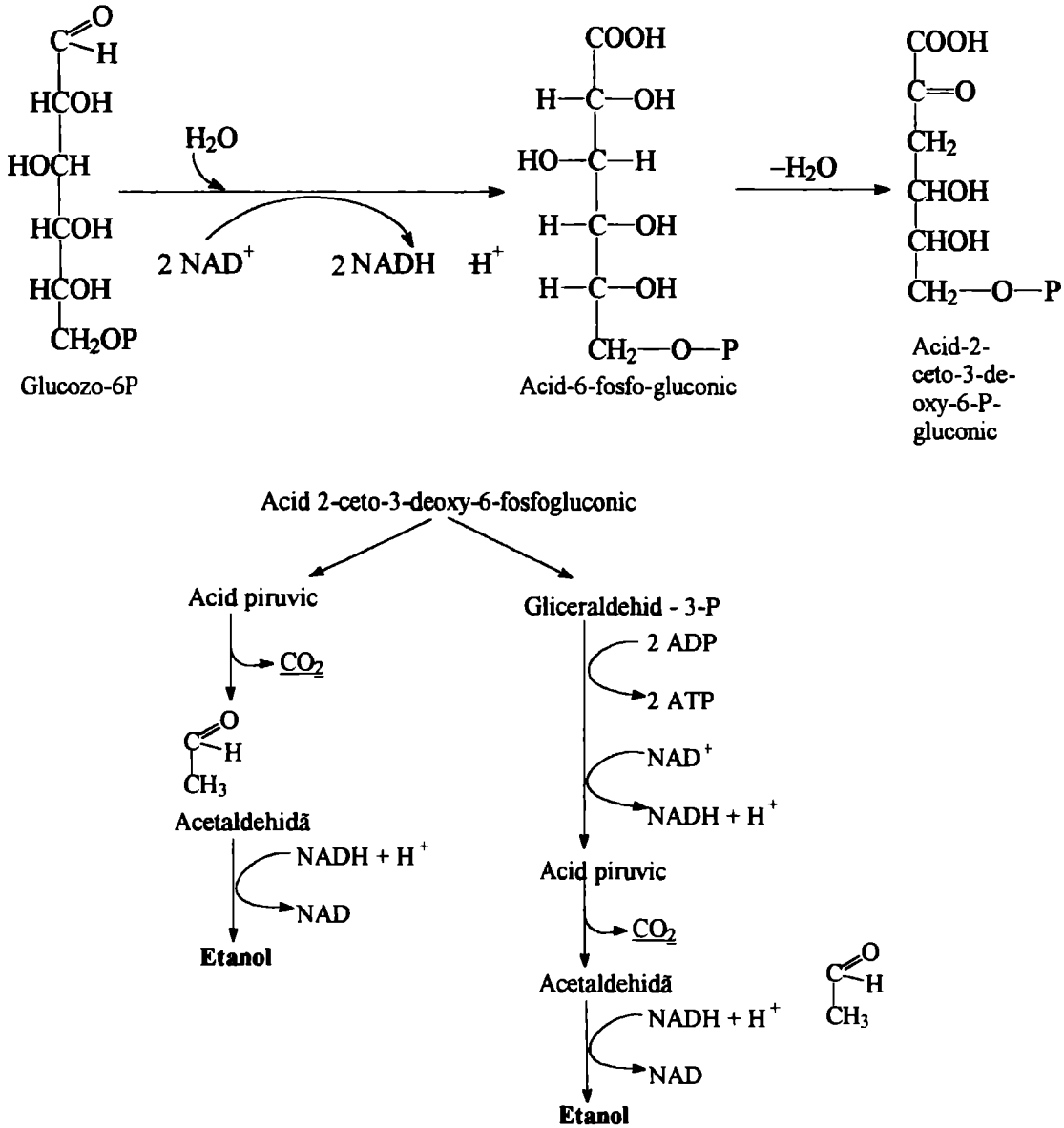


Fig. 68. Fermentaţia alcoolică a glucozei de către bacteriile g. *Zymomonas lindneri.*

Fermentaţiile acide

La cele mai multe bacterii, catabolizarea glucozei la acid piruvic se desfăşoară pe calea EMP.

Există câteva tipuri de fermentaţii, care se deosebesc de fermentaţia homolactică, prin reacţia de reducere a *piruvatului*, deoarece numai o parte a acestui intermediar este redusă direct la *lactat*, dar majoritatea moleculelor sale sunt supuse unei reacţii de *decarboxilare*, sub acţiunea piruvat decarboxilazei. Se formează *acetaldehida*, care este oxidată în trepte succesive, rezultatul fiind un amestec de produse de fermentaţie în care predomină *acizii.*

Echilibrul cantitativ al produselor finale depinde de echipamentul enzimatic al speciei bacteriene, dar şi de un mecanism general de reglare a metabolismului bacterian, în funcţie de pH-ul mediului de creştere. Dacă pH-ul scade sub un anumit nivel, datorită producerii iniţiale a *acizilor tari* (acetic, lactic), metabolismul bacterian este reglat spre producerea *acizilor mai slabi* (propionic, butiric) şi în anumite cazuri, a corpilor *cetonici* (butanediol) sau a *alcoolilor* (etanol, butanol).

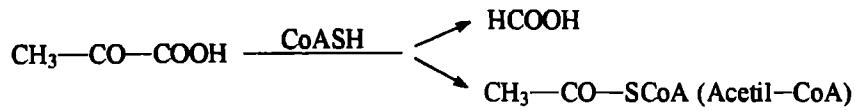
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cele mai multe fermentaţii bacteriene sunt acide. În funcţie de raportul cantitativ al produselor finale se disting următoarele tipuri:

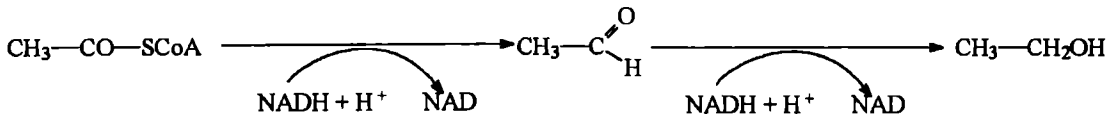
Fermentaţia acidă mixtă este caracteristică unui număr mare de enterobacterii negative pentru reacţia Voges-Proskauer. În varianta sa cea mai simplă, fermentaţia acidă mixtă este rezultatul a două serii principale de reacţii:

- *reducerea* directă a *piruvatului la lactat*
- *clivarea piruvatului la formiat şi acetil*, în prezenţa CoA.

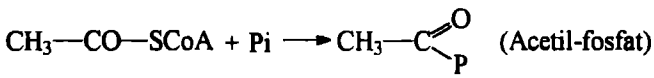
Reacţia este catalizată de formiat-piruvat-liază:



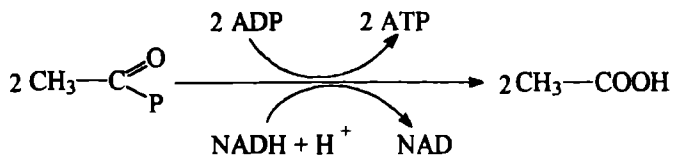
Unele grupări acetil din acetil-CoA sunt reduse de două ori: la acetaldehidă şi la etanol. Reacţia este catalizată de o alcool-dehidrogenază, legată de CoA:



Alte grupări acetil, care nu sunt necesare pentru oxidarea NADH pot fi folosite pentru a furniza ATP suplimentar. Fosfotransacetilaza catalizează transferul reversibil al acetatului, de la acetil-CoA, la fosfat, cu formarea acetil-fosfatului:



Într-o reacţie reversibilă, acetokinaza transferă fosfatul de la acetil-P, la ADP pentru a forma ATP şi eliberează acetatul:



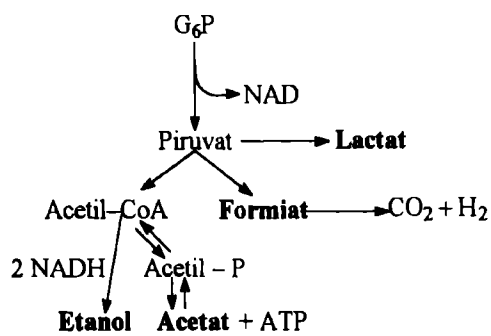


Fig. 69. Produsele finale ale fermentaţiei care derivă din piruvat.

Produsele finale ale fermentaţiei acide mixte sunt: lactatul, acetatul, etanolul şi formiatul. Consecutiv clivării formiatului, la multe enterobacterii *(E. coli)*, din fermentaţia glucozei rezultă gaze (CO_2, H_2). Dacă din echipamentul enzimatic lipseşte *formiat-liaza*, fermentaţia se produce fără gaze.

Unele enterobacterii, în special cele care au formiat-dehidrogenază, produc o cantitate mică de *acid succinic*, în prezenţa ATP, prin reacţia de condensare a unei molecule de CO_2 cu o moleculă de piruvat. Reacţia este catalizată de piruvat-feredoxin-oxidoreductază.

Proporţia produselor finale ale fermentaţiei, depinde de condiţiile de cultivare. Mediul de creştere se acidifică datorită acumulării acizilor rezultaţi în fermentaţie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fermentaţia butirică

Fermentaţia butirică este caracteristică, dar nu exclusivă, bacteriilor zaharolitice din g. *Clostridium*.

Butiratul se formează pe o cale metabolică ce începe cu clivarea *piruvatului*, în prezenţa CoA, în acetil-CoA, CO_2 şi H_2. CO_2 şi H_2 se formează direct, fără faza intermediară a acidului formic:

$$CH_3 - CO - COOH + CoASH \rightarrow CH_3 - CO - SCoA + CO_2 + H_2$$

Două molecule de acetil-CoA se condensează şi formează *aceto-acetil-CoA*. Aceto-acetil-CoA este redusă la butirat, după următoarea reacţie:

$$CH_3 - CO - CH_2 - CO - SCoA + 4\ NADH + H^+ + CH_3 - COOH \rightarrow$$
Aceto-acetil CoA
$$CH_3 - CH_2 - CH_2 - COOH + CH_3 - CO - SCoA + 4\ NAD^+$$
Acid butiric

O proporţie variabilă a moleculelor de acetil-CoA este hidrolizată la acetat şi regenerează CoA.

Unele specii ale g. *Clostridium* pot forma alte produse de fermentaţie: alcooli (butanol, etanol, izopropanol) şi acetonă, ce rezultă prin reducerea acizilor formaţi în fermentaţie.

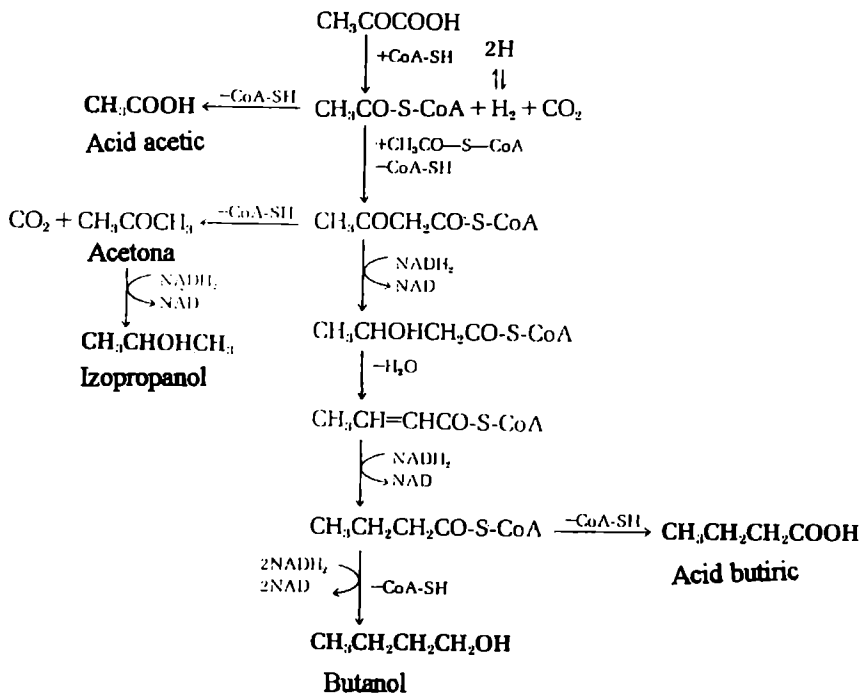


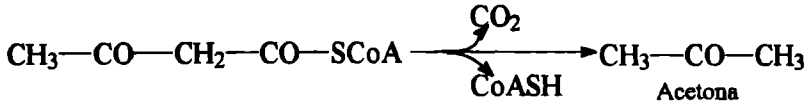
Fig. 70. Conversia acidului piruvic la produsele finale ale fermentaţiilor clostridiene.

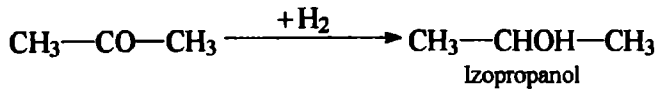
Conversia piruvatului la acetil-CoA implică sistemul enzimatic al piruvat-feredoxin-oxidoreductazei (PFO), o enzimă ce catalizează oxidarea piruvatului pentru a forma acetil-CoA şi CO_2. Feredoxina este un transportor de electroni, care îi poate dona unei hidrogenaze, cu formarea H_2. Feredoxinele sunt proteine cu Fe şi S, care funcţionează şi în alte reacţii: fixarea N_2, fotosinteză. PFO catalizează o reacţie rapidă de schimb între CO_2 şi gruparea COOH a piruvatului, reacţie ce poate fi folosită pentru a diferenţia PFO de alte enzime de clivare a piruvatului. În condiţii reducătoare, reacţia poate fi reversată, permiţând sinteza piruvatului din acetat şi CO_2.

PFO are un rol important în procesele de oxido-reducere ale bacteriilor anaerobe (*Clostridium*). Enzima permite reutilizarea H_2 ca potenţial reducător, având rol de *hidrogenază de înglobare*. Are un potenţial redox foarte mic, asemănător cu al H_2 (-0,42 V). Funcţia de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

hidrogenază de înglobare a PFO catalizează reducerea produselor primare acide ale fermentației mixte, rezultate din acidul piruvic, la molecule neutre: prin reducerea aceto-acetilului rezultă *butanol*, prin decarboxilarea aceto-acetil-CoA se formează *acetona*, iar prin reducerea acetonei rezultă *izopropanol*.





Recircularea H_2 și utilizarea sa ca potențial reducător păstrează echilibrul redox al mediului de creștere a acestor bacterii.

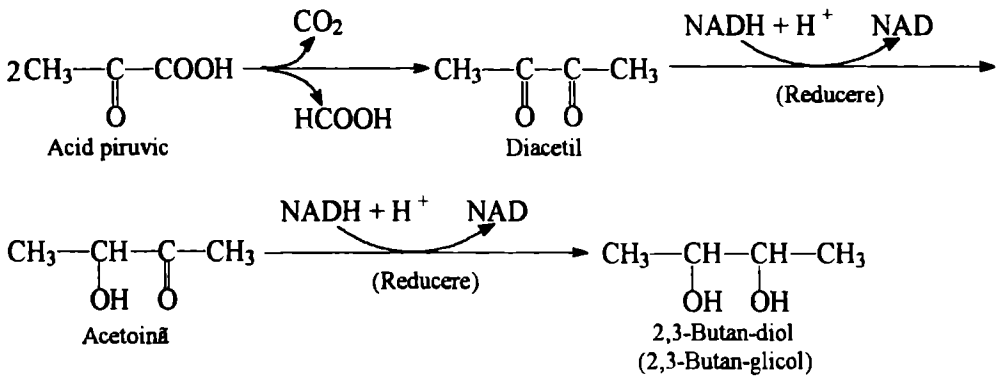
Fermentația butanediolului

Fermentația butanediolului (2,3 butan-glicol) este produsă de unele enterobacterii (*Vibrio, Aeromonas*), de unele specii de *Bacillus* și de unele bacterii lactice (*Streptococcus cremoris, Lactobacillus cremoris*).

Pe lângă sistemul enzimatic al fermentației acide mixte, ele au și setul de enzime al fermentației particulare, denumită *butanediolică sau butilen-glicolică*, care furnizează ca produs final, o moleculă neutră de 2,3-butanediol. Această cale metabolică intră în acțiune după ce pH-ul mediului de creștere scade sub 6.

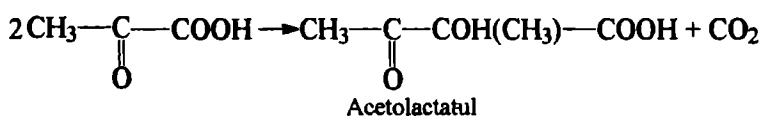
Reacția cheie a acestei căi este cea de *condensare* a două molecule de *piruvat*, prin decarboxilare și eliberare a acidului formic. Rezultă *diacetilul*, care este redus la *acetoină* (acetil-metil-carbinol).

Prin reducerea acetoinei se formează butanediolul, după următoarea reacție globală:



Diacetilul și acetoina dau aroma caracteristică untului. Diacetilul se formează din lapte (1 g/l). Citratul este scindat în acetat și oxalo-acetat. Oxalo-acetatul este decarboxilat la piruvat.

La enterobacterii, butanediolul se formează pe calea acetolactatului. Două molecule de piruvat se condensează printr-o reacție de decarboxilare și se formează acetolactatul:



Acetolactatul este decarboxilat sub acțiunea aceto-lactat-decarboxilazei și se formează *acetoina*, care este redusă la *butanediol*.

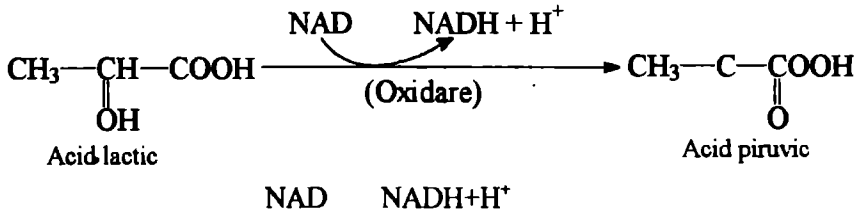
Calea fermentației butanediolice se evidențiază prin reacția Voges-Proskauer[2] și prin valoarea relativ ridicată a pH.

[2] Reacția Voges-Proskauer evidențiază capacitatea unor microorganisme de a produce prin fermentația glucozei, acetil-metil-carbinol(acetoina), care în prezența alcalilor este oxidat la diacetil. Diacetilul se combină cu arginina, creatina sau cu creatinina din mediu și determină apariția culorii roșii.

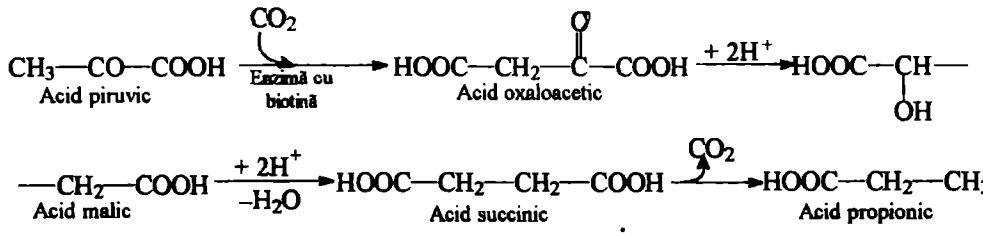
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fermentaţia acidului propionic

Acidul propionic este produs pe cale fermentativă de un grup de bacterii nesporulate din g. *Propionibacterium*. Ele pot fermenta *acidul lactic* (produsul final al altor fermentaţii bacteriene). Se formează acid propionic, acid acetic şi CO_2. Această cale de fermentaţie permite generarea ATP prin metabolizarea *acidului lactic sau a acidului piruvic*, rezultat pe calea glicolizei:



O parte din acidul piruvic este oxidat la CO_2 şi acetil-CoA. Acetil-CoA este utilizată pentru sinteza ATP şi a acetil-P, care ulterior este redus la acid acetic. O altă parte a acidului piruvic este carboxilat la acid oxalo-acetic:



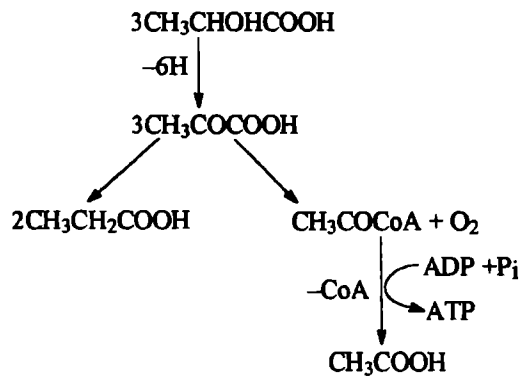
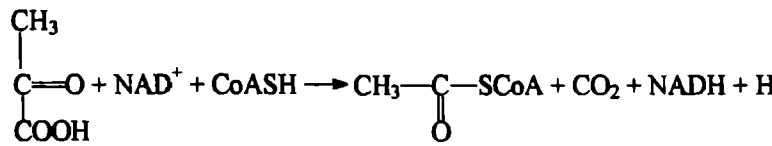


Fig. 71. Reprezentarea schematică a fermentaţiei acidului lactic la acid propionic.

Catabolismul piruvatului

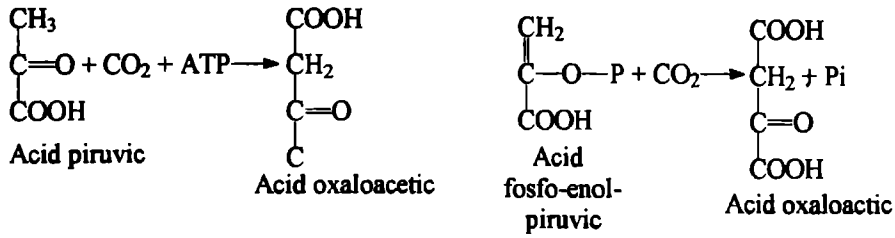
Piruvatul este catabolizat pe cale aerobă sau anaerobă. Microorganismele strict aerobe sau cele facultative, în prezenţa O_2 realizează decarboxilarea oxidativă a piruvatului şi formează acetil-coenzima A, care intră în ciclul Krebs, la nivelul oxalo-acetatului:



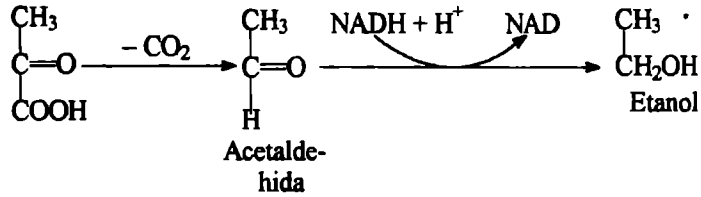
Dacă oxalo-acetatul nu se formează cu o rată corespunzătoare (datorită faptului că intermediarii ciclului Krebs, acidul alfa-cetoglutaric şi acidul succinic sunt precursorii altor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

constituienți), menținerea ciclului este posibilă prin sinteza suplimentară a acidului oxaloacetic, prin carboxilarea piruvatului sau a acidului fosfo-enol-piruvic:



În anaerobioză, piruvatul este decarboxilat sub acțiunea piruvat-decarboxilazei și se formează acetaldehidă și CO_2, redusă ulterior la etanol, de către bacteriile din g. *Zymomonas*:



Piruvat-decarboxilaza poate fi asociată cu un sistem transportor de electroni, până la CO_2.

Catabolismul lipidelor

Trigliceridele sunt hidrolizate la glicerol și acizi grași, sub acțiunea exo- sau endolipazelor. Aceste enzime sunt produse de mucegaiuri (*Aspergillus flavus, Penicillium roqueforti, Rhizopus sp., Geotrichum*), la levuri (*Candida lipolytica, Torulopsis, Saccharomyces cerevisiae*), la bacterii (*Serratia liquefaciens, Ps. aeruginosa, Alcaligenes sp., Staphylococcus aureus*).

Glicerolul intră în calea glicolizei, la nivelul *dihidroxi-aceton-fosfatului*, trecând prin *dihidroxi-acetona* sau prin *glicerol fosfat*. Ulterior, aceste produse sunt degradate pe *calea glicolizei*. Procesul este anaerob.

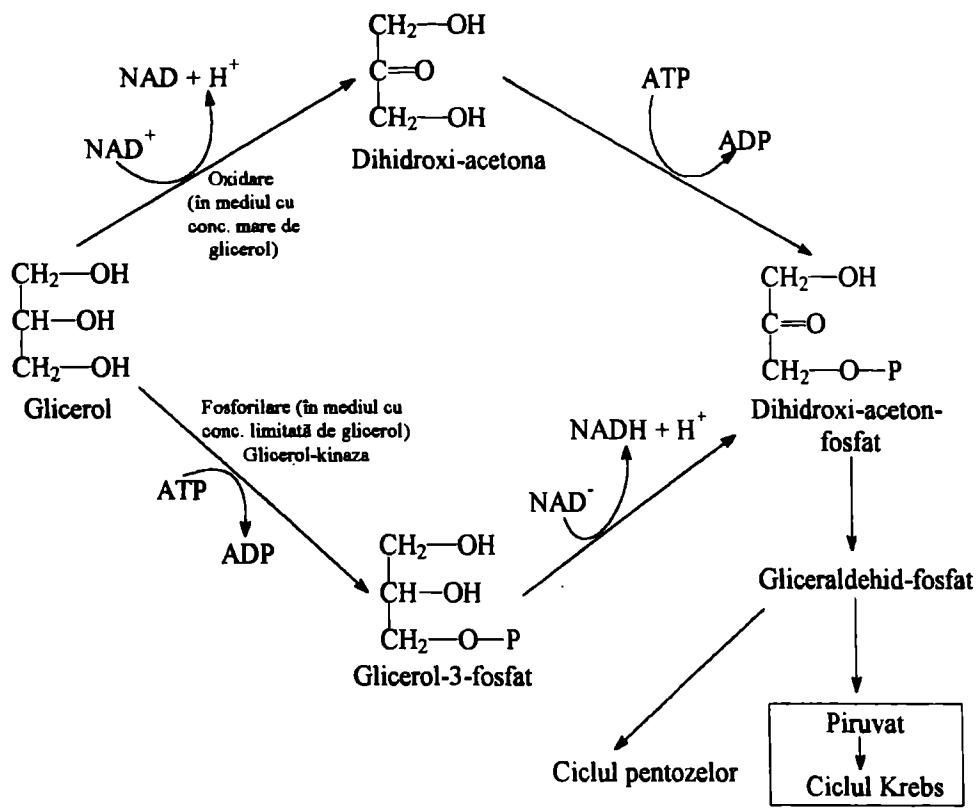


Fig. 72. Căile catabolismului glicerolului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acizii graşi sunt activaţi de ATP în prezenţa CoA şi se formează acil-CoA. Acesta este oxidat la carbonul beta şi prin hidroliză rezultă acetil-CoA, care este mai scurt decât cel iniţial cu doi atomi de carbon.

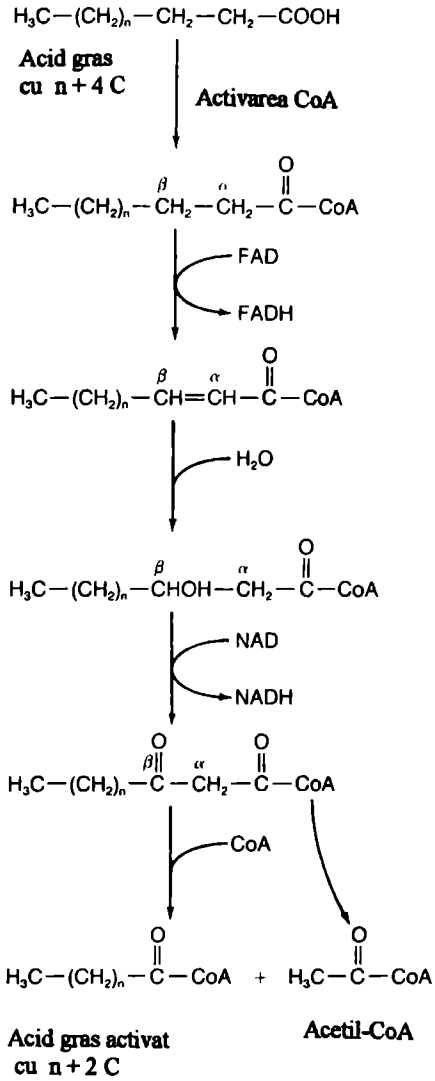


Fig. 73. Mecanismul beta-oxidării unui acid gras, care duce la formarea succesivă a acetil-CoA (cu doi atomi de C).

Catabolizarea compuşilor organici azotaţi

Numeroase bacterii (in special din g. *Clostridium* şi *Bacillus*) secretă exoproteaze care scindează lanţurile polipeptidice în fragmente de câţiva aminoacizi. Sinteza enzimelor proteolitice este represată dacă în mediu se adaugă hidrolizat de proteine sau amestec de aminoacizi. Peptidazele hidrolizează polipeptidele şi le transformă în aminoacizi. În funcţie de modul de acţiune asupra lanţului polipeptidic, peptidazele sunt de două tipuri: endopeptidaze şi exopeptidaze. La rândul lor, exopeptidazele sunt de două categorii :

- *aminopeptidaze*, cele care încep acţiunea lor la extremitatea NH_2 liberă a polipeptidului. Activitatea lor depinde de prezenţa ionilor metalici ;
- *carboxipeptidaze*, cele a căror acţiune se iniţiază la extremitatea COOH liberă a polipeptidului.

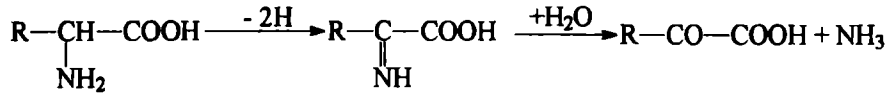
Acţiunea acestor enzime are ca efect formarea di- şi tripeptidelor, ulterior hidrolizate în aminoacizi.

Există două căi principale de catabolizare a aminoacizilor :

- *prin dezaminare*
- *prin decarboxilare*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dezaminazele microorganismelor sunt foarte diverse. Ele cuprind enzime oxidative şi neoxidative. Rezultatul dezaminării oxidative este formarea *iminoacidului*, care este apoi hidrolizat în acid alfa- cetonic şi NH_3.

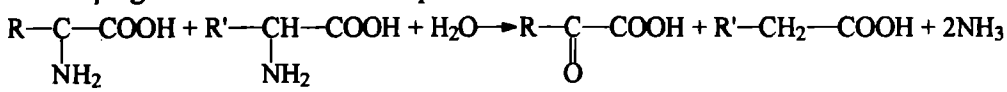


Dezaminarea neoxidativă poate fi de trei feluri:

- *dezaminare desaturantă*, cu formarea acidului nesaturat şi a NH_3;
- *dezaminare reductivă*, ce constă în reducerea aminoacizilor la acidul saturat corespunzator şi formarea NH_3;
- *dezaminare prin deshidratare*, o cale exclusivă a microorganismelor pentru aminoacizii hidroxilaţi. Se formează acidul cetonic şi NH_3;

Un tip special de dezaminare este *dezaminarea cuplată* (reacţia Stickland). Reacţia se numeşte dezaminare cuplată, deoarece necesită cel puţin o pereche de aminoacizi complementari, unul fiind oxidat, iar celălalt având rolul de acceptor de electroni.

Reacţia globală a dezaminării cuplate este următoarea:



Aminoacidul donor este oxidat sub acţiunea unei NAD- dehidrogenaze. Rezultatul reacţiei este dezaminarea celor doi aminoacizi. Acidul alfa-cetonic este decarboxilat secundar, reacţie în cursul căreia se produce fosforilarea la nivelul substratului (pentru o pereche de aminoacizi se sintetizează o moleculă de ATP).

Un exemplu tipic este fermentaţia *alaninei şi a glicinei*, după reacţia globală:

Alanina + 2 Glicina + 2 H_2O → 3 Acid acetic + 3 NH_3 + CO_2

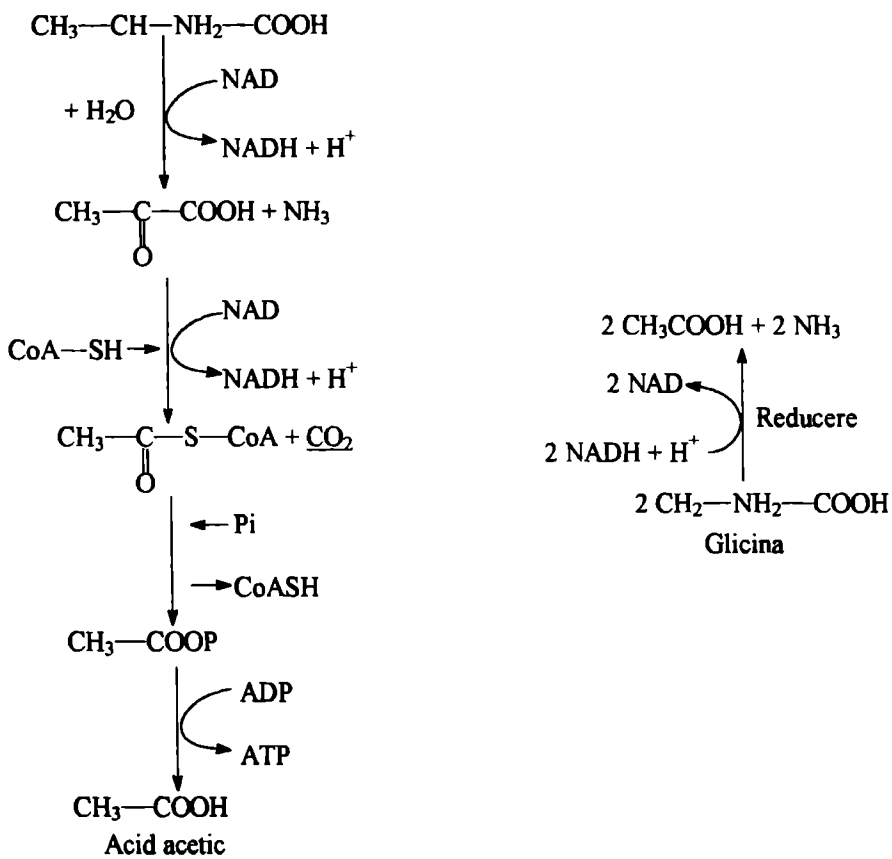


Fig. 74. Mecanismul reacţiei Stickland, ca modalitate a metabolismului fermentativ producător de energie. L-alanina are rol de donor de electroni, iar glicina este acceptoare. Ambele sunt convertite la acid acetic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După comportamentul lor în reacţia Stickland, aminoacizii se împart în trei grupe: reducători, oxidanţi şi cei care se comportă ca reducători sau oxidanţi, în funcţie de condiţiile de mediu.

Reacţia de dezaminare cuplată este catalizată de numeroase bacterii anaerobe (de exemplu, *Clostridium*).

Decarboxilarea aminoacizilor este o cale de catabolizare comună multor microorganisme, proteolitice sau neproteolitice. Se formează CO_2 şi o *amină*:

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH \rightarrow CO_2 + R{-}CH_2{-}NH_2$$

Un mediu acid favorizează biosinteza decarboxilazelor şi pH creşte, datorită producerii NH_3, ureii, aminelor, iar într-un mediu alcalin este stimulată sinteza dezaminazelor şi pH scade.

Catabolismul compuşilor aromatici

În raport cu capacitatea de a metaboliza compuşii aromatici, bacteriile se împart în trei categorii:

- cele care nu degradează astfel de compuşi;
- cele care realizează o degradare incompletă (de exemplu, enterobacteriile).

E. coli scindează *triptofanul* la indol şi piruvat, sub acţiunea unei triptofanaze, fără să deschidă ciclul benzenic sau pirolic. Reacţia de evidenţiere a indolului în mediile nutritive peptonate este un test de identificare a enterobacteriilor, utilizat frecvent;

- bacteriile care metabolizează complet compuşii aromatici, prin ruperea structurilor ciclice şi formarea compuşilor intermediari simpli, utilizabili în reacţiile metabolismului intermediar. Reacţia de clivare a moleculelor ciclice este generatoare de energie.

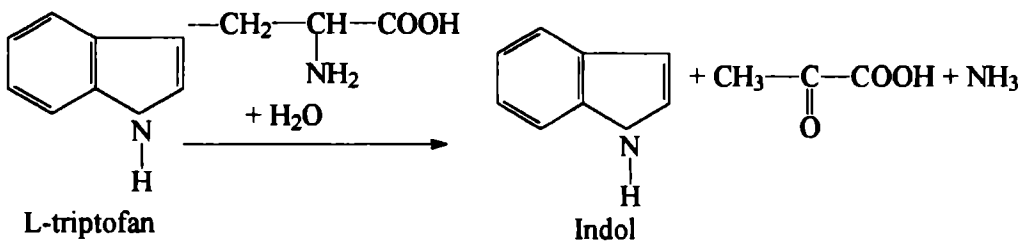


Fig. 75. Reacţia de degradare a triptofanului de către E. coli.

O categorie specială de substanţe organice relativ rezistente la acţiunea degradativă a bacteriilor, sunt *hidrocarburile*. Molecula lor conţine numai atomi de C şi H. Hidrocarburile cu catena lineară sunt degradate de reprezentanţii câtorva genuri de bacterii *(Nocardia, Pseudomonas, Mycobacterium)* şi de levuri, dar cele ciclice sunt foarte rezistente la acţiunea degradativă.

Unele specii de *Pseudomonas* îşi obţin energia prin catabolizarea hidrocarburilor aromatice din petrol. Procesul este aerob, ceea ce explică stabilitatea depozitelor de petrol pentru perioade foarte lungi, dar după expunerea la aer, hidrocarburile din petrol sunt oxidate.

Reacţia de degradare a hidrocarburilor este catalizată de *monoxigenază* şi implică participarea O_2 ca reactant. Unul din atomii moleculei de O_2 este încorporat în molecula oxidată. Oxidarea compuşilor aromatici are ca rezultat formarea unor molecule cu un singur ciclu aromatic (catecol, protocatecol, gentisat, homogentisat).

În etapa a II-a se produce clivarea ciclului monoaromatic, în orice punct al său. Rezultă compuşi care intră în ciclul Krebs (succinat, acetil-CoA, piruvat). Degradarea fenil-alaninei şi tirozinei trece prin gentisat şi homogentisat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

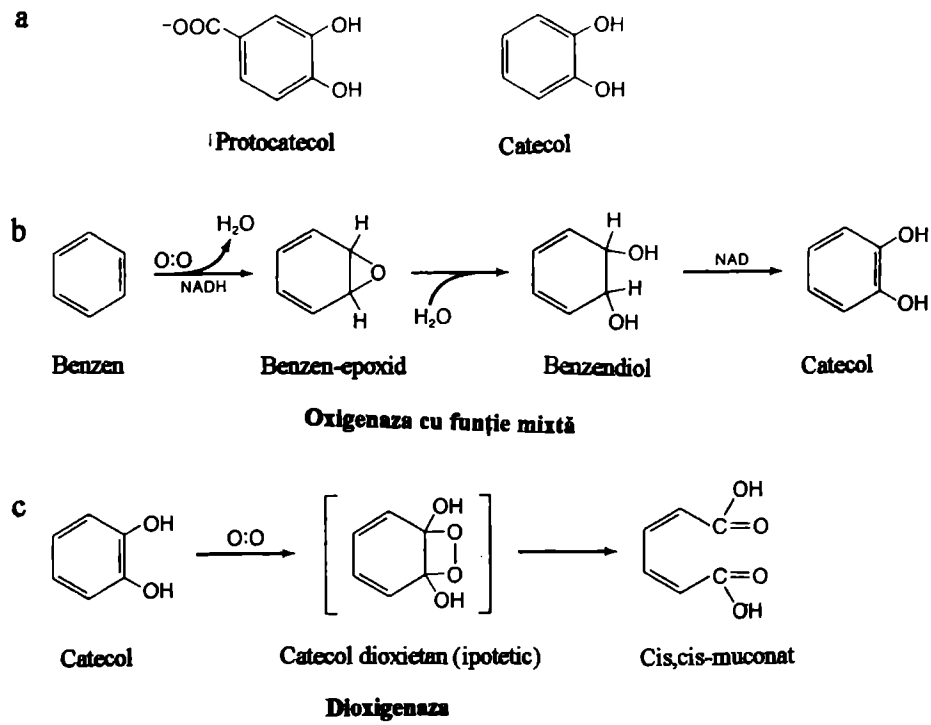


Fig. 76. Rolul oxigenazelor în catabolismul compușilor aromatici. a. Protocatecolul și catecolul rezultă din oxidarea inelului benzenic. b. Hidroxilarea benzenului la catecol, de către o oxigenază cu funcție mixtă, în care NADH este al II-lea donor de electroni. c. Clivarea catecolului la cis, cis - muconat.

Bacteriile din g. *Pseudomonas* degradează numeroase molecule ciclice: naftalenul, fenantrenul, antracenul, toluenul, benzenul, fenolul, salicilatul, triptofanul etc. Compușii care conțin în moleculă un atom de oxigen (fenolul), pot fi degradați în anaerobioză, prin clivarea reducătoare a inelului. Rezultă un acid gras linear sau un acid dicarboxilic.

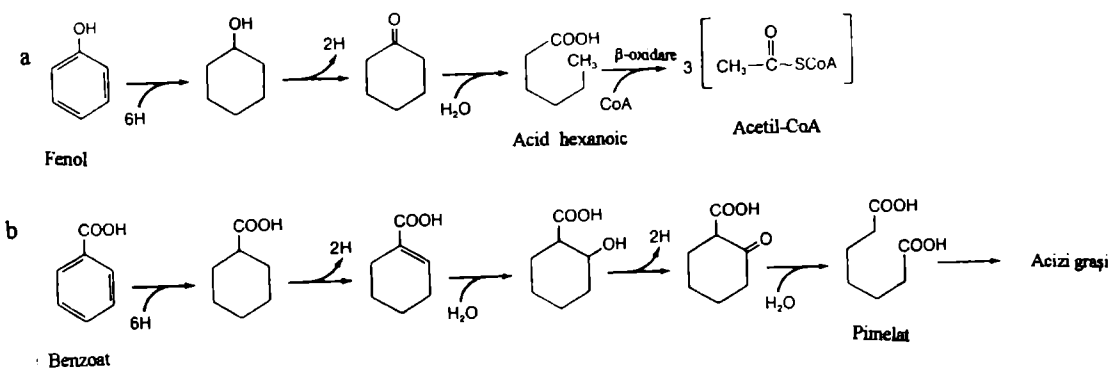


Fig. 77. Degradarea anaerobă a fenolului și a benzoatului prin clivarea reducătoare a inelului (după Brock, 1988).

Catabolismul compușilor cu un atom de carbon(C_1). Bacteriile metilotrofe și metanotrofe

Compușii mai reduși decât CO_2 care conțin unul sau mai mulți atomi de C, dar nu conțin legături C-C formează *grupul* C_1.

Metanul este un compus abundent în mediile naturale, fiind produs de bacteriile metanogene în mediile naturale anaerobe: nămolul anaerob, tractul intestinal al ierbivorelor, orezării, prin degradarea anaerobă a deșeurilor organice reziduale și menajere, dar și în activități antropologice nebiogene: exploatarea minieră a cărbunelui, arderea biomasei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Între bacteriile metilotrofe şi metanotrofe există deosebiri cu privire la substratul pe care îl degradează. Numeroase specii de bacterii cresc pe metanol, metil-amină sau pe formiat, dar nu metabolizează metanul. Ele sunt bacterii heterotrofe (*Pseudomonas, Bacillus, Vibrio*) şi *metilotrofe facultative*, deoarece, pe lângă metanol, degradează şi alţi compuşi cu unul sau mai mulţi atomi de carbon. Degradarea lor este iniţiată de metanol-dehidrogenază.

Bacteriile *metanotrofe* au caracteristici metabolice particulare, deoarece utilizează atât compuşi mai reduşi decât CO_2, cu un singur atom de carbon, cât şi metanul şi sunt *metilotrofe obligate*.

Bacteriile care oxidează metanul au un sistem enzimatic specific: *metan-monooxigenaza*, enzima care catalizează introducerea unui atom de oxigen în molecula de metan, rezultând metanolul:

$$CH_4 \rightarrow CH_3OH \rightarrow HCOH \rightarrow HCOOH \rightarrow CO_2 + H_2$$

Metan-monooxigenaza are un spectru larg de acţiune asupra alcanilor, alchenelor, hidrocarburilor aromatice şi halogenate (de exemplu, diclor-metan). Enzima se găseşte sub două forme: citoplasmatică ("solubilă") şi asociată membranei ("particulată").

Carbonul este asimilat sub formă de formaldehidă sau sub forma CO_2, pe calea serinei.

Bacteriile metanotrofe sunt *aerobe*. Trăiesc la periferia zonei anaerobe, unde CH_4 şi O_2 se găsesc simultan. De exemplu, ele se găsesc în metalimnionul lacurilor dimictice (sisteme aquatice stratificate, în care apa circulă liber de două ori pe an, între cele două straturi majore: epilimnion şi hipolimnion).

Metanul se formează ca produs final al descompunerii materiei organice în stratul profund al acestor lacuri şi difuzează până în metalimnion, unde întâlneşte oxigenul dizolvat în apă. Metanotrofele localizate în stratul îngust de apă, oxidează CH_4 şi împiedică trecerea lui în atmosferă.

Din punct de vedere biochimic, bacteriile metanotrofe au o semnificaţie ecologică deosebită, deoarece metanul este un gaz abundent în atmosferă (1,6 ppm), ocupând locul al II-lea, după CO_2. Concentraţia sa a crescut cu o rată de circa 1% pe an, în ultimii 150 – 200 de ani. Deoarece absoarbe radiaţia în spectrul infraroşu mult mai eficient decât CO_2, contribuţia sa la încălzirea globală a atmosferei (efectul de seră) tinde să o egaleze pe aceea a CO_2.

Catabolismul alcoolului etilic

Unele levuri (*Debaromyces, Hansenula, Pichia*) şi unele bacterii metabolizează complet alcoolul etilic, până la CO_2 şi apă.

Bacteriile acetice (*Acetobacter, Gluconobacter*) oxidează alcoolul etilic, la acid acetic. Oxidarea alcoolului etilic, totală sau parţială, are ca intermediar, *acetaldehida*:

$$CH_3—CH_2—OH + NAD^+ \rightarrow CH_3—\underset{\underset{O}{\|}}{C}H + NADH + H^+$$

Levurile oxidează acetaldehida la acetil-CoA şi în condiţii de aerobioză o încorporează în ciclul Krebs;

$$CH_3—\underset{\underset{O}{\|}}{C}H + CoASH + NAD^+ \rightarrow CH_3—\underset{\underset{O}{\|}}{C}—SCoA + NADH + H^+$$

Bacteriile acetice oxidează acetaldehida, direct la acid acetic:

$$CH_3—\underset{\underset{O}{\|}}{C}H + H_2O + NAD^+ \rightarrow CH_3COOH + NADH + H^+$$

Oxidarea acetaldehidei este o reacţie aerobă şi este baza producerii industriale a oţetului alimentar, prin diferite metode. După epuizarea alcoolului, unele bacterii acetice oxidează acidul acetic la CO_2 şi H_2O, prin intermediul acetil-CoA.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Bacteriile acetice sunt aerobe şi se deosebesc de bacteriile *acetogene anaerobe*, prin aceea că nu oxidează complet sursa lor energetică. Oxidarea alcoolului etilic are loc numai până la *acid acetic*, care se acumulează în mediu şi pH scade. Bacteriile acetice sunt acido-tolerante.

Reacţiile de anabolism

Reacţiile de anabolism se desfăşoară în sensul utilizării metaboliţilor intermediari ai căilor centrale, pentru sinteza constituienţilor proprii celulei bacteriene. Procesele anabolice evoluează în două faze, care se desfăşoară în sens invers în raport cu cele catabolice. Rezultatul lor este sinteza constituienţilor celulari.

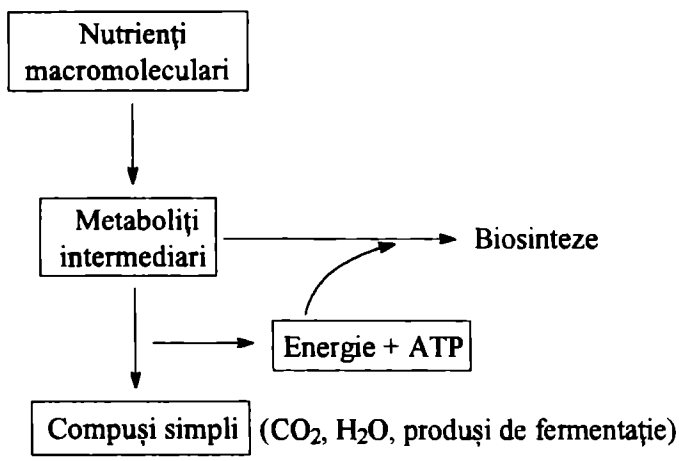
Celulele bacteriene sintetizează două tipuri de macromolecule:

- macromolecule *informaţionale*, codificate de mesaje genetice, cu caracter de specificitate, de importanţă biologică fundamentală;
- macromolecule de rezervă (de depozit), cu o structură în general uniformă, formate prin legarea unor monomeri, în polimeri de diferite mărimi.

Sinteza macromoleculelor informaţionale se realizează cu o mare eficienţă, deoarece, în procesele metabolice, într-o fază iniţială, nespecifică, sunt furnizate subunităţile de construcţie: aminoacizi, baze purinice şi pirimidinice. În cea de a II-a faza, controlată genetic se desfăşoară procesele specifice de biosinteză a macromoleculelor informaţionale, care poartă denumirea generică de *diataxie*, în cursul căreia subunităţile specifice sunt polimerizate într-o ordine riguros exactă, conformă mesajului genetic.

Căile amfibolice. Sub această denumire sunt reunite căile centrale ale metabolismului, care, simultan au rolul de a elibera energie şi de a produce molecule precursoare pentru biosinteze.

Caracterul amfibolic este conferit de faptul că energia şi anumiţi intermediari ai căilor catabolice sunt utilizaţi în reacţii de anabolism, după următoarea schemă generală:



Existenţa căilor amfibolice este expresia interacţiunii dintre căile catabolice şi anabolice, care funcţionează simultan în citoplasma necompartimentată a celulei bacteriene.

Căile anaplerotice

Căile anaplerotice (sau de aprovizionare) sunt căi metabolice auxiliare. Nevoia existenţei lor derivă din faptul ca nutrienţii din mediu sunt degradaţi progresiv pentru eliberarea energiei sau sunt folosiţi în reacţiile de biosinteză. Calea metabolică principală ce furnizează metaboliţii intermediari, esenţiali pentru catabolism şi anabolism trebuie reaprovizionată cu compuşi care provin din alte căi metabolice, ce se desfăşoară simultan în celulă. Astfel, se asigură funcţionarea îndelungată şi la o rată optimă a căii metabolice principale.

Calea anaplerotică a *glioxilatului*, are ca rezultat final, regenerarea *oxaloacetatului*, molecula acceptoare a acetatului în ciclul Krebs. Dacă oxaloacetatul este intens folosit în biosinteze, funcţionarea ciclului acizilor tricarboxilici va diminua. Pentru a evita scăderea ratei de producere a energiei, se sintetizează suplimentar un compus cu 4 atomi de C. Dacă substratul energetic este un *glucid*, compusul cu 4 atomi de C se formează prin *carboxilarea piruvatului*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dacă substratul energetic este acetatul sau un acid gras, microorganismele aerobe nu reduc acetatul la piruvat. Acetatul intră în ciclul Krebs, dar izocitratul nu este decarboxilat succesiv prin cele două trepte, până la succinat. În celula bacteriană este indusă sinteza a două enzime care şuntează cele două reacţii de decarboxilare între izocitrat şi succinat.

Izocitratul este scindat de izocitrat-liază şi rezultă *glioxilat şi succinat*. Glioxilatul se combină cu o altă moleculă de acetat din acetil-CoA şi rezultă *malat*, care restabileşte ciclul. Procesul ciclic în cursul căruia acetatul nu este convertit la CO_2 poartă denumirea de *ciclul glioxalic*.

Bacteriile şi plantele sintetizează acetil-CoA din acetat şi coenzima A, într-o reacţie consumatoare de ATP, catalizată de ATP-sintetaza.

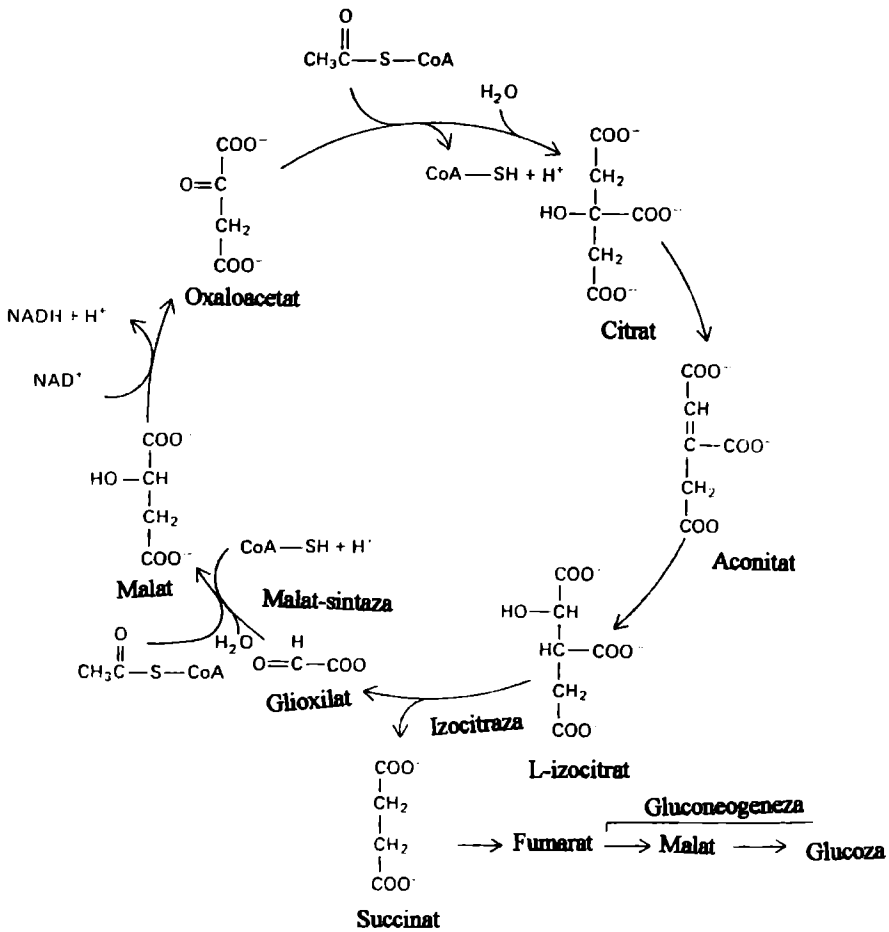
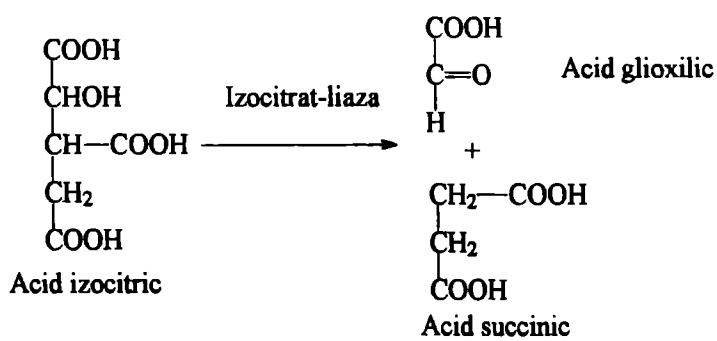
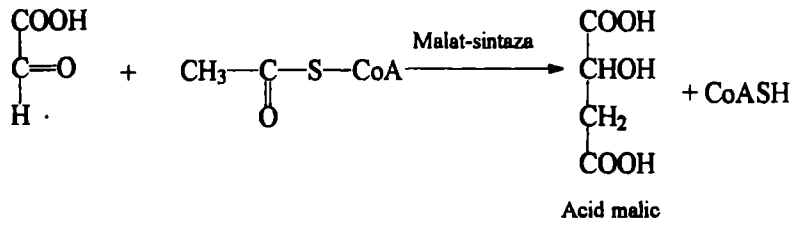


Fig. 78. Şuntul glioxilatului şi raporturile sale cu reacţiile ciclului acizilor tricarboxilici. Reacţia esenţială a ciclului este clivarea izocitratului în glioxilat şi succinat. Malatul se sintetizează din glioxilat şi acetil-CoA. Celelalte reacţii ale ciclului sunt aceleaşi ca şi în ciclul Krebs. Ciclul glioxilatului este activ când substratul energetic este catabolizat la acetat şi nu funcţionează când sunt degradate glucidele, deoarece sunt catabolizate la acid piruvic.



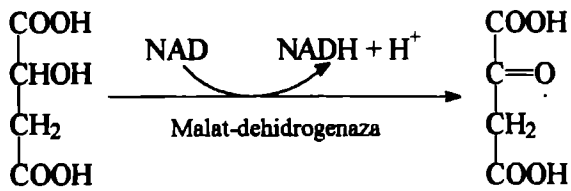
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Într-o a II-a reacţie, acidul glioxilic este condensat cu acetil-CoA şi formează *acidul malic.*



Acid malic

Acidul malic este oxidat şi rezultă acidul oxaloacetic :



Acidul malic Acidul oxaloacetic

Acidul oxaloacetic acceptă noi molecule de acetat, pe care le introduce în ciclul Krebs.

Procesul ciclic în cursul căruia, acetatul nu este convertit la CO_2 poartă denumirea de *ciclul glioxalic.*

În concluzie, reacţiile metabolice ale celulelor bacteriene, ca mecanism general de desfăşurare sunt similare cu cele care au loc în celelalte sisteme vii, dar se deosebesc prin faptul că, în special căile catabolice sunt mai diversificate, ca o consecinţă directă a naturii foarte heterogene a substraturilor degradate.

Faptul că în privinţa mecanismului general de desfăşurare, căile metabolice sunt similare cu ale celorlalte organisme a permis ca numeroase descoperiri ale biologiei moleculare să se facă pe sistemul bacterian şi să se extrapoleze la celula eucariotă:

- ciclul Krebs
- diferitele căi metabolice
- procesele de oxido-reducere
- mecanismul sintezei proteinelor

Din acest punct de vedere, culturile bacteriene au constituit un model ideal de investigare. Ele au avantajul creşterii rapide pe medii sintetice (cu compoziţie bine determinată). A devenit astfel posibilă, determinarea precisă a modificărilor chimice ale mediului de creştere, prin evidenţierea diminuării cantitative a unor componente şi acumularea produselor de catabolism sau prin încorporarea precursorilor marcaţi ai mediului nutritiv, în macromolecule.

Deosebirea esenţială constă în aceea că la bacterii funcţionează căi catabolice particulare, care nu se regăsesc la alte organisme şi care permit celulelor bacteriene să catabolizeze substanţe chimice greu degradabile: cauciuc, asfalt, diferiţi compuşi aromatici etc.

Chiar dacă în ansamblul sistemelor vii, celula bacteriană este un minimum vital, ea este rezultatul unui îndelung proces de evoluţie. „Bacteria funcţionează cu o asemenea virtuozitate, pentru că timp de 2 milioane de ani, strămoşii ei au exersat procesele biochimice, păstrând reţeta fiecărei reuşite" (Monod).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL V

INFLUENŢA FACTORILOR FIZICI ŞI CHIMICI ASUPRA MICROORGANISMELOR

Activitatea biologică normală a microorganismelor este profund influenţată de condiţiile fizice si chimice ale mediului. Activitatea lor este maximă, când condiţiile mediului sunt optime în raport cu necesităţile speciei. Condiţiile optime de viaţă pentru microorganisme se întâlnesc foarte rar în mediile naturale, dar ele compensează printr-o mare capacitate de adaptare şi printr-o rezistenţă superioară la condiţiile nefavorabile, comparativ cu organismele superior organizate. Cunoaşterea influenţelor mediului asupra microorganismelor este obligatorie pentru înţelegerea distribuţiei lor în natură şi pentru elaborarea metodelor de control a activităţii microorganismelor şi distrugerea celor nedorite.

Răspunsul microorganismelor la diferite condiţii de mediu nu este uniform: unele sunt inhibate, iar altele sunt stimulate.

INFLUENŢA FACTORILOR FIZICI ASUPRA MICROORGANISMELOR

Temperatura

Temperatura este unul din cei mai importanţi factori de mediu care influenţează creşterea şi supravieţuirea organismelor. Rata reacţiilor chimice şi enzimatice în celulă, creşte odată cu creşterea temperaturii, dar acizii nucleici şi alte componente celulare sunt sensibile la temperaturi crescute şi pot fi inactivate ireversibil.

Temperatura de dezvoltare. Pentru fiecare specie de organism, există o temperatură *minimă*, sub nivelul căreia creşterea nu mai are loc, o temperatură *optimă*, la care creşterea este cea mai rapidă şi o temperatură *maximă*, deasupra căreia creşterea nu mai este posibilă. Spectrul termic care permite desfăşurarea normală a proceselor metabolice şi deci creşterea şi multiplicarea microorganismelor reprezintă zona *temperaturii de dezvoltare*. *Temperatura optimă* de dezvoltare este mai apropiată de valoarea maximă, decât de cea minimă. Cele trei puncte termice, denumite *temperaturi cardinale* sunt, în general, caracteristice pentru fiecare tip de organism, dar nu sunt fixe, deoarece pot fi modificate de alţi factori, ca de exemplu, pH şi concentraţia nutrienţilor. Temperatura de dezvoltare poate fi cuprinsă în limite restrânse (35–40°), la microorganismele *stenoterme* şi în limite largi (6–50°) la cele euriterme. In general, temperatura de dezvoltare este cuprinsă între –5° şi 70–80°. Această variaţie corespunde temperaturii *minime, optime* şi *maxime*. Organismele stenoterme trăiesc în habitate cu temperatură relativ constantă, iar cele euriterme populează mediile în care temperatura variază considerabil.

Temperatura minimă de dezvoltare reprezintă valoarea termică cea mai scăzută la care microorganismele se mai multiplică încă în mod evident. La această temperatură, rata metabolismului este scăzută, iar rata creşterii şi diviziunii celulare este mult încetinită. Limita inferioară a temperaturii minime de dezvoltare este determinată, teoretic, de temperatura de îngheţare a apei, dar se situează sub 0° (–5°), deoarece punctul de congelare a constituienţilor celulari este mai scăzut decât acela al apei pure.

În condiţii particulare, care măresc zona de stabilitate fizică a apei celulare (conţinutul ei bogat în diferite substanţe şi presiunea osmotică ridicată), temperatura minimă tolerată de microorganisme poate să scadă până la –18°. Aceasta explică procesul de multiplicare a unor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

specii bacteriene în apa mării, la temperaturi de –5–11°, iar mucegaiurile şi unele bacterii (*Pseudomonas*) pot creşte la –18°, în soluţii concentrate de zahăr. Creşterea şi multiplicarea unei generaţii bacteriene durează în aceste condiţii, săptămâni şi chiar luni.

Chiar în materialele îngheţate se găsesc pungi microscopice de apă lichidă, unde microorganismele pot să crească.

Temperatura minimă de dezvoltare a microorganismelor mezofile ar fi determinată de încetarea transportului substanţelor dizolvate prin membrana celulară. Mecanismele biochimice ale inactivării transportului membranar ar putea fi următoarele:

- modificarea conformaţională a moleculelor proteice;
- modificarea arhitecturii membranei celulare;
- limitarea producerii şi utilizării ATP.

Temperatura optimă de dezvoltare este definită de nivelul termic la care dezvoltarea unei populaţii de microorganisme ale unei specii are loc cu o rată maximă. Această valoare nu coincide cu aceea a temperaturii optime pentru alte activităţi fiziologice ale celulei. De aceea, numărul maxim de celule vii se acumulează, nu atunci când diviziunea are loc foarte rapid, ci în condiţiile unui ritm mai lent de diviziune, probabil datorită diferenţelor de temperatură optimă necesară diferitelor activităţi celulare. La o temperatură mai ridicată, creşte rata acumulării produselor de catabolism şi implicit efectul lor toxic devine inhibitor pentru creşterea celulară. In mod similar, viteza de fermentaţie sau de acumulare a unui anumit produs de metabolism, este maximă la valori termice care nu coincid obligatoriu cu temperatura optimă pentru diviziunea celulară. De aceea, nu se poate vorbi despre o temperatură optimă pentru creştere şi diferite activităţi biologice, ci de temperatura optimă pentru fiecare din activităţi, luate în parte.

Temperatura maximă de dezvoltare reprezintă valoarea cea mai ridicată la care activitatea biologică a unui anumit organism este încă posibilă, iar multiplicarea sa se mai poate face în mod evident. Această valoare, limitată de termolabilitatea proteinelor şi acizilor nucleici este de obicei cu 10–15° mai mare decât temperatura optimă pentru microorganismul respectiv.

In funcţie de temperatura lor de dezvoltare, microorganismele pot fi grupate în trei categorii:

a) *Microorganismele criofile* sau *psichrofile* cresc cel mai bine la temperaturi scăzute. Ele trăiesc în izvoarele reci, în lacuri şi mări, în regiunile de altitudine şi polare. Aceste microorganisme prezintă un mare interes economic, deoarece pot altera produsele alimentare conservate prin congelare.

b) *Microorganismele mezofile* se dezvoltă la temperaturi medii (10–45°). Ele fac parte din microbiota normală a animalelor homeoterme, faţă de care se comportă ca saprobionte. Din aceiaşi categorie fac parte microorganismele parazite.

c) *Microorganismele termofile* se dezvoltă în apele termale şi în platformele de deşeuri menajere şi din zootehnie.

Microorganisme criofile

Organismele care cresc la temperaturi scăzute se numesc *criofile* sau *psichrofile*. Apartenenţa unui microorganism la această categorie este condiţionată de capacitatea lui de a creşte la 0°.

Se disting două categorii de organisme psichrofile: *obligate* şi *facultative*.

Organismele obligat-criofile se dezvoltă la o temperatură optimă de cel mult 15°, iar temperatura maximă, este de circa 2o°.

Microorganismele *criofile facultative*, deşi pot creşte la 0°, cresc cu o rată optimă la 25–30°, iar temperatura maximă de creştere este de 35–40°. Criofilele obligate sunt *stenoterme*, iar cele facultative sunt *euriterme*. Psichrofilele obligate trăiesc în medii cu temperatura constant scăzută. La temperatura de 25–30°, ele mor rapid, ceea ce îngreunează studiul lor. Organismele psichrofile sunt un grup divers: bacterii, fungi, alge. Cele mai studiate psichrofile obligate sunt algele eucariote, ce formează mase dense în interiorul şi sub gheaţa regiunilor polare. Algele psichrofile se găsesc adeseori, pe suprafaţa zăpezii şi gheţii, în număr atât de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mare, încât determină culoarea roşie sau verde a suprafeţei. Cea mai comună algă care creşte pe zăpadă este *Chlamidomonas nivalis*. Celula vegetativă este pigmentată verde. Odată cu topirea zăpezii, are loc sporularea. Sporii au culoarea roşie.

Organismele psichrofile facultative se găsesc în solul şi în apele din regiunile cu climat temperat. Temperatura optimă de creştere este de 25–30°, iar cea maximă, de 35°. Deoarece mediile din regiunile temperate se încălzesc în sezonul cald, ele nu sunt favorabile creşterii organismelor psichrofile obligate.

Microorganismele psichrofile facultative sunt implicate în alterarea calităţii produselor alimentare de origine animală şi vegetală, conservate prin răcire sau îngheţare. Cu cât temperatura de conservare este mai scăzută, cu atât multiplicarea microorganismelor este mai lentă sau chiar imposibilă.

Creşterea la temperaturi scăzute a microorganismelor psichrofile este explicată prin proprietăţile enzimelor lor, capabile să catalizeze mai eficient la temperaturi scăzute. Probabil, din această cauză, psichrofilele sunt foarte sensibile la temperaturi mai mari, fiind inactivate rapid la 30–40°.

Procesele de transport activ funcţionează optim la temperaturi scăzute, iar conţinutul membranei celulare în acizi graşi nesaturaţi este mai crescut decât la alte organisme. Consecinţa este că la temperaturi scăzute, membrana rămâne semifluidă. Membranele cu conţinut ridicat de acizi graşi saturaţi sunt mai rigide şi la temperaturi scăzute devin nefuncţionale.

Îngheţarea. Temperatura de îngheţare a diferitelor medii este dependentă de compoziţia şi concentraţia substanţelor dizolvate. Îngheţarea opreşte creşterea microorganismelor, dar moartea celulară nu survine totdeauna. Celulele mari sunt mai sensibile la îngheţare, iar cele cu perete celular gros sunt mai rezistente. Îngheţarea este una din cele mai bune metode de conservare a culturilor de microorganisme.

Prin îngheţare, unele celule sunt omorâte, dar dacă supravieţuiesc, ele rămân viabile pentru perioade lungi de timp. Procesele vitale sunt suspendate (funcţiile celulare sunt oprite) şi sunt reluate după restabilirea regimului termic. Leziunile celulare ce rezultă din îngheţarea apei intracelulare sunt consecinţa efectului fizic al cristalelor de gheaţă, în special asupra membranei celulare. Îngheţarea rapidă produce cristale mici şi leziunile pot fi minime. De aceea, îngheţarea trebuie făcută rapid. Astfel, levurile rămân viabile într-o proporţie optimă, dacă răcirea se face cu 10°/minut, iar pentru hematii, răcirea cu 20°/minut oferă cea mai bună protecţie. Severitatea efectelor deshidratării este limitată de glicerol şi dimetilsulfoxid, adăugate în proporţie de 0,5M la mediul de suspensie. Ele sunt miscibile cu apa şi penetrează în celulă.

Moleculele mari (albumina serică, dextranul, polivinil-pirolidona) la concentraţia de 10^{-5}–10^{-3} M, nu penetrează în celule. Efectul lor protector se realizează prin combinarea cu molecule ale suprafeţei celulei şi astfel este prevenită lezarea membranei celulare.

Rezistenţa celulelor la îngheţare, este folosită pentru conservarea lor într-un mediu adecvat. Cu cât temperatura este mai scăzută, cu atât condiţiile de păstrare sunt mai bune. Temperatura de –70° este mai bună decât cea obişnuită de –20°, iar temperatura de –195° a azotului lichid este cea mai bună.

Microorganisme mezofile

Microorganismele mezofile au temperatura optimă de dezvoltare, cuprinsă între 25 şi 40°. Cele care au temperatura de creştere mai mare de 30° se dezvoltă în cavităţile macroorganismelor homeoterme, ca saprobionte sau parazite. De exemplu, *E. coli* se dezvoltă optim la temperatura de 39°. Bacteriile mezofile asociate organismelor homeoterme sunt relativ *stenoterme*. Această proprietate este evidentă la microorganismele patogene.

Microorganismele mezofile cresc cu o rată scăzută la o temperatură mai mică de 20°. Sub 10°, creşterea lor este oprită, deoarece se blochează iniţierea sintezei proteice, dar sinteza celor deja iniţiate nu este afectată. La o temperatură scăzută este inhibată şi funcţia enzimelor. Inhibitorul este probabil, un metabolit obişnuit, care la temperatură scăzută se leagă foarte strâns de enzimă. Odată cu creşterea temperaturii, inhibitorul se disociază şi enzima îşi reia funcţia.

Acest mecanism de acţiune este sprijinit de existenţa a două categorii de mutante: *mutantele sensibile la rece* şi cele *rezistente la rece*. Mutantele sensibile la rece nu cresc la 15°

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(la care tulpina salbatică creşte), deoarece enzima mutantă leagă inhibitorul feed-back mai ferm decât enzima de tip sălbatic. Mutanta rezistentă la rece produce o enzimă mai puţin sensibilă la inhibiţia prin feed-back, decât tipul sălbatic.

La *E. coli* s-au izolat mutante termo-sensibile, care nu cresc la temperatura la care creşte tulpina salbatică. Aceste mutante produc o proteină mai sensibilă la denaturarea termică, decât proteina omologă de tip sălbatic.

Deşi s-au izolat mutante cu limite termice superioare sau inferioare faţă de tipul sălbatic, temperatura lor optimă de dezvoltare rămâne aceiaşi, deoarece este condiţionată de un număr mare de proteine.

S-a studiat răspunsul microorganismelor mezofile la şocul hipo- sau hipertermic. Expunerea microorganismelor mezofile la temperaturi mai înalte, determină reacţia de *răspuns la şocul termic*. Răspunsul la şocul termic constă într-o creştere rapidă şi trecătoare a ratei de sinteză a unor proteine, denumite *proteine de şoc termic*. Creşterea ratei sintezei lor este rapidă – în decurs de ordinul secundelor – după expunerea culturii bacteriene la o temperatură superioară.

Trecerea culturii de *E. coli*, de la 37° la 46°, induce o creştere de 100 de ori a ratei sintezei proteinelor de şoc termic, însă rata globală a sintezei proteinelor scade. Proteinele de şoc termic sunt factori de rezistenţă faţă de temperaturile letale. Ele fac parte din categoria *chaperonilor*. Chaperonii sunt proteine constitutive normale, a căror rată de sinteză creşte brusc după şocul termic.

Răspunsul la şocul termic s-a evidenţiat nu numai la bacteriile mezofile, ci şi la cele termofile, la cele psichrofile şi la *Archaea*.

Invers, prin scăderea temperaturii la 10°, unele bacterii sintetizează un set de circa 14 proteine, denumite *proteine de şoc la rece*, deşi rata globală a sintezei proteinelor scade. Unele proteine de şoc la rece au rolul de a stabiliza capacitatea de transcriere a ADN şi de traducere a mesajului în proteine.

Stressul înfometării determină un răspuns ce constă în sinteza a 30–50 de proteine cu rol adaptativ. Infometarea celulelor bacteriene are ca rezultat creşterea rezistenţei lor la diferite stressuri, inclusiv la temperaturi scăzute.

Reactivitatea celulei la diferite stressuri, este codificată de *genele de stress*. Ele codifică factori activatori ai setului de gene ce codifică sinteza proteinelor de adaptare la stress.

Microorganisme termofile

Microorganismele termofile cresc la temperaturi mai mari de 45–50° şi au o răspândire limitată în mediile naturale. Solul expus luminii solare se încălzeşte la temperaturi mai mari de 50°, iar solurile de culoare închisă se încălzesc la 70°. Materialele care fermentează (deşeuri menajere, materiale vegetale) ating temperaturi de circa 70°. Cele mai ridicate temperaturi în natură sunt asociate cu fenomenele vulcanice. Adeseori, izvoarele termale ating temperatura de fierbere. Pe măsură ce apa se îndepărtează de sursă, se realizează un gradient termic, cu o distribuţie a speciilor de microorganisme, dependentă de nivelul termic.

Organismele procariote sunt capabile să crească la temperaturi mai mari, comparativ cu organismele eucariote. Cele nefotosintetizante tolerează temperaturi superioare, în raport cu cele fotosintetizante.

In interiorul grupului microorganismelor termofile sunt diferenţe ale temperaturii optime de dezvoltare: unele cresc la 55°, altele la 70°, altele la 80°. Puţine specii cresc la temperatura de fierbere a apei: *Sulfolobus*, *Thermus*.

Mecanismul biochimic al toleranţei la temperaturi crescute nu este bine cunoscut. Enzimele microorganismelor termofile conţin lipide membranare bogate în acizi graşi saturaţi, care permit membranelor să rămână stabile şi funcţionale la temperaturi ridicate. Acizii graşi saturaţi formează legături hidrofobe mai puternice decât acizii graşi nesaturaţi, ceea ce explică stabilitatea membranei.

Absenţa microorganismelor eucariote la temperaturi mai mari de 60°, se poate datora termolabilităţii inerente a membranelor, în special a membranei nucleare, mitocondriale sau cloroplastice. Membranele mitocondriale sunt deosebit de sensibile la caldură. Prin încălzirea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

celulelor cu câteva grade peste temperatura maximă, mitocondriile dispar. Membranele organitelor celulei eucariote sunt suficient de fluide pentru a permite trecerea macromoleculelor. Membrana nucleară este permeabilă pentru ARNm şi pentru subunităţile ribosomale, care trec în citoplasmă. La temperaturi crescute, membrana nucleară îşi pierde funcţionalitatea.

Microorganismele hipertermofile

Bacteriile hipertermofile se dezvoltă foarte bine la temperaturi cuprinse intre 80–110°. Nu cresc la temperaturi mai mici de 60–80°. Ele se găsesc în regiunile hidrotermale submarine anaerobe, bogate in H_2S, H_2, S° şi SO_3^{2-} şi cu o concentraţie salină caracteristică apei marine, precum şi în emanaţiile de gaze fierbinţi din cratere vulcanice ce conţin vapori de apă, CO_2 şi H_2S. Câteva specii au fost încadrate printre eubacterii, dar majoritatea aparţin archaebacteriilor.

Bacteriile hipertermofile sunt anaerobe. La temperaturi scăzute, la care nu cresc, tolerează prezenţa O_2.

Mecanismul molecular al hipertermofiliei nu este cunoscut. Deoarece proteinele şi acizii nucleici sunt inactivate la temperaturi de 60–70°, se consideră ca hipertermofilia s-ar datora existenţei unor factori termostabilizatori (necunoscuţi), prezenţei unor enzime cu structură globulară particulară, existenţei unor proteine de tip histonic cu rol termoprotector, precum şi configuraţiei mai strânse a dublei helice a ADN, care ar îngreuna separarea catenelor componente.

Temperatura maximă de creştere a acestor microorganisme ar fi de 110–150°, la care biomoleculele termosensibile ar putea fi sintetizate cu o rată suficient de mare pentru a înlocui pe cele denaturate termic.

Sterilizarea

Temperaturile supramaximale moderate îşi datorează efectul letal, procesului de intoxicaţie metabolică, deoarece, ridicarea temperaturii accelerează reacţiile metabolice.

Temperaturile supramaximale omoară majoritatea microorganismelor, prin efectul lor denaturant asupra proteinelor celulare şi în special asupra enzimelor. Concomitent, se produce topirea membranelor lipidice.

Efectul letal al temperaturilor supramaximale are o aplicaţie practică majoră: *sterilizarea*.

Creşterea temperaturii peste un nivel maxim produce efecte letale. Moartea celulelor prin încălzire se produce după o curbă exponenţială şi este mai rapidă la temperatură crescută. De aceea, pentru distrugerea prin sterilizare a unei populaţii celulare, la temperaturi inferioare, este necesar un interval de timp mai mare. Pentru sterilizarea unui material se alege temperatura şi, în funcţie de nivelul termic, procesul are o durată corespunzătoare.

Tratamentul termic nu are efect cumulativ asupra celulei. Durata de timp în care celula a fost expusă la căldură, înainte de a muri, nu are efect perceptibil. La organismele pluricelulare, tratamentul termic pare să aibă efect cumulativ.

Se consideră ca moartea microorganismelor sub acţiunea căldurii este un eveniment de ordinul 1 (adică lipseşte efectul cumulativ al acţiunii factorului termic) şi este rezultatul inactivării unei singure entităţi moleculare critice.

Moartea termică a celulei procariote se datorează efectului asupra membranei. La temperatură crescută, lipidele membranare se dizolvă şi discontinuităţile de dimensiuni critice determină pierderea constituienţilor celulari şi moartea.

Rezistenţa microorganismelor la căldură este diferită. Cele psichrofile sunt mai sensibile, iar cele termofile au cea mai mare rezistenţă.

Natura mediului în care se face încălzirea influenţează rezistenţa celulelor vegetative şi a sporilor. Moartea survine mai rapid la pH acid şi de aceea alimentele acide sunt mai uşor de sterilizat, comparativ cu cele neutre. Concentraţiile mari de glucide, proteine şi lipide măresc rezistenţa organismelor la acţiunea căldurii. In mediu uscat, celulele sunt mai rezistente decât în mediul umed. De aceea, sterilizarea termică a obiectelor uscate, necesită temperaturi mai înalte şi intervale de timp mai lungi decât sterilizarea umedă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Endosporul bacterian are o termorezistenţă net superioară, comparativ cu a celulelor vegetative, conferită de trei factori: termorezistenţa proteinelor, deshidratarea şi mineralizarea.

Factorul major al rezistenţei termice este cantitatea şi starea fizică a apei (apa legată) din endospor. În timpul sporulării, protoplasma se reduce la un volum minim. Se acumulează cantităţi mari de Ca^{2+} şi de acid dipicolinic (prezent numai în spor). Citoplasma dobândeşte o stare de gel. Cortexul sporal gros condiţionează indirect rezistenţa termică, deoarece impiedică îmbibarea sporului cu apă, dar sporii fără cortex sunt la fel de rezistenţi ca şi sporii obişnuiţi. Proteinele sporale pot avea o rezistenţă intrinsecă la căldură sau termostabilitatea le este conferită de asocierea cu dipicolinatul de Ca^{2+}. În celula sporală se găsesc proteine specifice, de dimensiuni mici, acidosolubile, asociate cu ADN, dar şi proteine neasociate cu macromoleculele sporului.

Principiile sterilizării termice şi dezinfecţiei

Principiile sterilizării se ilustrează cel mai bine, utilizând căldura ca agent de acţiune, ale cărei efecte sunt bine cunoscute.

Rata morţii bacteriilor care contaminează un material este logaritmică, dar mult accelerată.

Principiul 1: o proporţie definită din totalul celulelor, mor într-un interval de timp dat. Dacă la o temperatură dată, în primul minut mor 30% din totalul celulelor, în cel de al II-lea minut mor 30% din rest ş.a.m.d.

Când numărul celulelor bacteriene dintr-o probă supusă sterilizării, rămâne foarte mic, de exemplu 100, după primul minut rămân 70 viabile, după al II-lea rămân 49, după al III-lea 34, iar după 12 minute – o celulă. Probabilitatea de a găsi un singur organism viu rămâne foarte mică. O probă este sterilă, atunci când probabilitatea de a găsi un organism viu nu depăşeşte 1/1000.

Principiul 2: cu cât o probă conţine mai puţine microorganisme, cu atât timpul necesar sterilizării este mai scurt. Curăţirea cât mai avansată a obiectelor, înainte de a le steriliza este o aplicaţie practică a acestui principiu. Materia organică diminuă eficienţa multor agenţi chimici.

O specie bacteriană are o sensibilitate diferită la acţiunea unui agent, în funcţie de faza de creştere. Cea mai sensibilă fază, pentru cele mai multe microorganisme, este cea de creştere logaritmică, deoarece în această fază sunt active toate reacţiile de biosinteză şi interferenţa cu o singură enzimă poate să omoare celula. Sporii sunt foarte rezistenţi.

Principiul 3: microorganismele diferă în privinţa sensibilităţii lor la acţiunea agenţilor antimicrobieni.

Presiunea osmotică

Presiunea osmotică în interiorul celulelor bacteriene este ceva mai mare decât aceea a soluţiei reprezentate de un mediu uzual de cultivare. Aceasta se datorează faptului că celula conţine în stare solvită, concentraţii mai mari de substanţe minerale şi organice pe care le poate reţine datorită permeabilităţii selective a membranei ei citoplasmatice. Ca urmare, apa din mediu tinde să pătrundă în celulă pentru egalizarea concentraţiilor intra- şi extracelulare de substanţe dizolvate. De aceea, în condiţii normale, celula bacteriană se află într-o stare de turgescenţă determinată de forţele intracelulare de distensie, caracteristice tuturor celulelor vii.

Dezvoltarea bacteriilor decurge în condiţii optime, dacă mediul lor de viaţă are o presiune osmotică aproximativ echivalentă celei intracelulare, reprezentând pentru ele o soluţie *izotonă*.

Spre deosebire de celulele animale, foarte sensibile la variaţiile presiunii osmotice, bacteriile – protejate de un perete celular elastic dar rezistent – suportă relativ usor modificările presiunii osmotice, dacă abaterile de la izotonie survin lent, treptat, permiţând funcţiilor compensatoare de adaptare a membranei citoplasmatice să intre eficient în acţiune. Dacă însă, echilibrul izotonic se dereglează brusc, acţiunile care tind să refacă echilibrul osmotic determină liza mecanică a peretelui celular, ceea ce expune celula la degradări profunde cu efect letal.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Abaterile mari de la izotonie ale unui mediu de suspensie a bacteriilor, generează două tipuri de modificări celulare caracteristice:

1) In medii *hipertone* (de exemplu, în soluţii saline concentrate), bacteriile suferă fenomenul de *plasmoliză*, în cursul căruia, datorită pierderii apei, care trece în mediu – volumul celulei se micşorează, iar citoplasma se retractă sub forma unei mase sferice sau ovalare, desprinsă de peretele celular;

2) In medii *hipotone* (de exemplu, în apă) se produce fenomenul de *plasmoptiză*. Datorită pătrunderii apei din exterior, turgescenţa celulei creşte până când presiunea intracelulară, depăşind capacitatea de distensie a peretelui celular, determină dezagregarea unor structuri parietale. Peretele se sparge şi conţinutul celular este eliberat în mediu.

Pentru dezvoltarea optimă, bacteriile necesită ca în mediul de creştere, presiunea osmotică să fie mai mică decât cea intracelulară. O excepţie o constituie microorganismele osmofile, care se dezvoltă numai în medii cu presiune osmotică ridicată. Ele sunt *halofile* (obligate sau facultative), dacă cresc pe medii cu salinitate mare, sau *zaharofile*, dacă se dezvoltă pe medii cu concentraţii mari de zahăr (50–70%).

Spre deosebire de marea majoritate a microorganismelor, care tolerează sarea în anumite limite, microorganismele *halofile* se dezvoltă normal în condiţiile unui mediu cu salinitate crescută. Halofilele *facultative* se dezvoltă în condiţii obişnuite de izotonie, dar cresc bine şi pe medii cu concentraţii mai mari de sare (până la 10–12% NaCl). Halofilele *obligate* se dezvoltă numai în medii nutritive care conţin concentraţii mari de sare, ce ating 16-35% NaCl şi 2% $MgSO_4$. Microorganismele halofile fac parte din microbiota normală a mărilor şi oceanelor, a lacurilor sărate şi a salinelor. Halofilele se găsesc, deasemenea, uneori, în alimentele sărate (măsline, peşte sărat, anchois), pe care le pot altera, dar în general au acţiune utilă, participând la procesele de "maturare" a unor alimente ca brânzeturi, carne sarată etc.

In raport cu limitele relativ restrânse ale salinităţii care favorizează creşterea optimă a microorganismelor, gama concentraţiilor de sare pe care microorganismele le tolerează, este mult mai largă: de la nivelul salin infim din apa bidistilată (cu un conţinut organic de 70 µg/l), la care este posibilă supravieţuirea unor bacterii heterotrofe, până la concentraţia enormă de circa 500 g de săruri/litru, la care pot creşte unii fungi (*Aspergillus oryzae* şi *A. terricola*). Bacteriile halofile extreme cresc în condiţii saline suprasaturate. Ele supravieţuiesc chiar pe cristalele de sare rămase după evaporarea apei.

Osmoreglarea (ajustarea presiunii osmotice intracelulare în funcţie de presiunea osmotică a mediului extracelular) se realizează prin procese active ce au loc in timpul adaptării la stressul osmotic al mediului. Multe specii de bacterii răspund la presiunea osmotică crescută a mediului, acumulând molecule cu greutate mică, la concentraţii intracelulare mari, pentru a echilibra concentraţia crescută a ionilor în mediul extracelular.

Substanţele acumulate în citoplasmă, în condiţiile unui mediu hipertonic şi care nu sunt inhibitorii pentru activitatea enzimelor, chiar la concentraţie înaltă, adică sunt compatibile cu metabolismul celular,se numesc "soluţii compatibile" sau *osmoprotectoare*.

Moleculele cu greutate mică echilibrează osmoliţii externi, astfel încât este menţinută presiunea de turgor a celulei. Substanţele osmoprotectoare se acumulează în celulă, prin transport din mediul extracelular, iar alteori numai prin sinteza *de novo*: aminoacizi şi derivaţii lor, trehaloza (un dizaharid), glicin-betaina, prolin-betaina etc.

Microorganismele osmofile şi osmotolerante au o deosebită importanţă economică, deoarece pot altera alimentele conservate în soluţii concentrate de sare (saramuri) sau de zahăr (siropuri), soluţii care, faţă de microorganismele obişnuite exercită un efect microbiostatic.

Presiunea hidrostatică

In mări şi oceane, presiunea hidrostatică are valori diferite, în funcţie de adâncime şi atinge valori foarte înalte în zonele abisale. La fiecare 10 m adâncime, presiunea hidrostatică creşte cu circa o atmosferă, corespunzătoare coloanei de apă.

Microorganismele care cresc la presiuni hidrostatice mari sunt *barotolerante* şi respectiv *barofile*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Unele suportă (adică cresc şi se divid) diferenţe mari de presiune (1-1600 atm) şi se numesc *euribare*, iar cele care se dezvoltă în limite restrânse ale variaţiei presiunii hidrostatice sunt *stenobare*.

Sub acţiunea presiunii hidrostatice mari, la *E. coli* se produce întârzierea creşterii, precum şi modificări morfologice ce constau în apariţia celulelor filamentoase.

O specie izolată din adâncurile abisale (11 034 m) – *Pseudomonas bathycetes* creşte la 3° şi la 1000 atm, cu durata unei generaţii celulare calculată la 33 de zile.

Creşterea presiunii hidrostatice şi scăderea temperaturii produc modificări asemănătoare ale lipidelor membranare. Ambii factori măresc vâscozitatea lipidelor membranare şi produc astfel o tranziţie de la starea fluidă – lichid cristalină – la faza mai solidă, cea de gel.

In compoziţia lipidelor membranare, la bacteriile barofile creşte cantitatea de acizi graşi nesaturaţi, ceea ce pare să condiţioneze menţinerea unei fluidităţi membranare compatibilă cu funcţiile sale, contracarând efectele presiunii hidrostatice înalte.

Energia radiantă

Radiaţiile electromagnetice au un spectru larg al lungimii de undă şi includ radiaţiile herziene (undele radio), infraroşii, ale spectrului vizibil, ultraviolete (UV), X şi gama. Ele sunt fenomene ondulatorii şi fascicule discontinue de mici cuante de energie. Iradierea reprezintă propagarea orientată a unui fascicul de cuante de energie asupra unui material, iar efectele asupra acestuia sunt consecinţa absorbţiei energiei radiaţiilor şi depind de energia cuantei şi de natura materialului absorbant.

Radiaţiile herziene, ca şi cele infraroşii, cu lungime de undă mare (lambda, mai mare de 12 000 A°) au un potenţial energetic atât de scăzut, încât nu produc modificări chimice ale substanţelor de care sunt absorbite şi de aceea, energia lor este convertită integral şi imediat în căldură.

Radiaţiile cu lungimea de undă cuprinsă între 12 000 A° (infraroşu apropiat) şi 2000 A° (ultraviolet îndepărtat) au un potenţial energetic suficient de mare pentru a produce modificări fotochimice ale moleculelor de care sunt absorbite.

Radiaţiile cu lungimea de undă mai mică de 2ooo A° (radiaţiile X, gama şi cosmice) au un potenţial energetic atât de mare încât produc ionizarea moleculelor pe care le întâlnesc, de unde şi denumirea lor de radiaţii *ionizante*.

Efectele biologice ale radiaţiilor depind de lungimea lor de undă şi de cantitatea totală de energie incidentă (doza de iradiere). In funcţie de aceşti doi factori, iradierea poate avea două efecte distincte asupra celulelor:

- *efectul letal* într-o dinamică logaritmică, adică în fiecare interval succesiv de timp, celulele mor într-o proporţie care rămâne constantă;
- *efectul mutagen*, care constă în modificarea unor caractere genotipice a unei părţi din celulele expuse şi se manifestă prin apariţia, la aceste celule, a unor însuşiri fenotipice noi: rezistenţa la infecţia cu un bacteriofag, dobândirea sau pierderea capacităţii de a sintetiza un anumit metabolit etc.

Radiaţiile luminoase acţionează asupra celulelor prin intermediul unor reacţii fotochimice cu constituienţii celulari. Cele mai studiate sunt reacţiile implicate în procesul de fotosinteză şi în fenomenele de fototaxie, întâlnite la microorganismele fototrofe (bacterii, cianobacterii, alge).

Lumina solară directă este bactericidă, probabil datorită nu atât acţiunii radiaţiilor UV, cât mai ales încălzirii, deshidratării consecutive prin radiaţiile infraroşii şi a celulelor expuse: deşi soarele este o sursă puternică de raze UV, stratul de ozon din pătura superioară a atmosferei absoarbe majoritatea radiaţiilor cu o lungime de undă mai mică de 2900 A°. In plus, lumina vizibilă exercită şi efecte cu caracter mai specific, indiferent de componenta calorică sau ultravioletă a luminii solare, dintre care unele sunt însă condiţionate de o iradiere ultravioletă concomitentă sau prealabilă.

l) *Fotosensibilizarea* reprezintă fenomenul de intensificare a efectului biologic al radiaţiilor luminoase, ca urmare a prezenţei în mediul extracelular, a unor substanţe inactive la întuneric, care se activează în prezenţa luminii. De exemplu, în prezenţa unor coloranţi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

fluorescenţi (albastru de metilen, roşu bengal), lumina vizibilă puternică denaturează proteinele şi astfel omoară celulele bacteriene şi inactivează virusurile. Aceşti coloranţi reţin un timp mai îndelungat o cuantă absorbită, timp în care energia este transferată altei molecule, în loc să fie emisă ca fluorescentă. Transferul de energie determină reducerea unor aminoacizi (histidina, triptofan) şi a bazelor azotate din acizii nucleici.

2) *Fotoprotecţia* constituie rezultatul biologic al acţiunii antagoniste a radiaţiei luminoase faţa de efectele unei iradieri simultane cu ultraviolete. Modificările celulare caracteristice pentru iradierea cu UV, sunt atenuate sau chiar prevenite printr-o expunere concomitentă la radiaţiile din spectrul luminii vizibile.

3) *Fotoreactivarea* este procesul de restaurare, de revenire la normal, a unor celule expuse prealabil la radiaţii UV, realizat sub acţiunea luminii vizibile, care este capabilă să "repare" alterările celulare, consecutive iradierii cu UV. Dintr-o populaţie bacteriană iradiată letal cu UV, un număr de celule "reînvie" după expunerea la lumină, în următoarele trei ore.

Radiaţiile ultraviolete au acţiune inhibitorie netă asupra creşterii microorganismelor. Efectul lor depinde şi de durata iradierii. Dozele mici, de scurtă durată au efect mutagen şi de inducţie litică a celulelor lizogene sau blocarea temporară a multiplicării celulare. Dozele mari produc modificări profunde, ireversibile, cu efect letal. Radiaţiile UV, cu lungimea de undă cuprinsă intre 2300 şi 2800 A° sunt cele mai active din punct de vedere biologic. Efectul letal maxim îl au radiaţiile cu lungimea de undă de 2600 A° (2537 A°), corespunzător spectrului maxim de absorbţie a UV de către ADN. Purinele şi pirimidinele din acizii nucleici absorb radiaţiile de 2600 A°, iar inelele aromatice ale triptofanului, tirozinei şi fenilalaninei din proteine, pe cele cu lungimea de undă de 2800 A°.

Radiaţiile UV produc modificări ale moleculei de ADN, ce constau în formarea *dimerilor de timină*, între resturile adiacente situate pe aceiaşi catenă, sau pe cele două catene. Consecinţa este oprirea procesului de replicare sau alterarea secvenţei bazelor în catena nou sintetizată. Restul aparatului celular rămâne funcţional, astfel încât, iradierea celulelor, urmată de infecţia fagică, restrânge sinteza ARNm şi a proteinelor, la cele codificate de fag.

Cele mai multe alterări celulare induse de radiaţiile UV pot fi reparate dacă microorganismele şi virusurile sunt expuse acţiunii luminii cu lungime de undă mai mare, fenomen denumit *fotoreactivare* (reparare sub acţiunea luminii). Din această cauză, eficienţa sterilizării cu raze UV este foarte mică.

Radiaţiile UV sunt emise de lămpi cu vapori de Hg la presiune mică (peste 90% din radiaţii au lungimea de undă de 2540 A°) şi sunt folosite pentru diminuarea contaminării aeriene din diferite incinte.

Radiaţiile UV penetrează foarte puţin prin corpurile solide, astfel că o peliculă fină de grăsime pe sursa emiţătoare, poate reduce mult efectul letal. Cele mai multe tipuri de sticlă şi materiale plastice absorb extensiv lumina UV. Sterilizarea are loc numai la doze înalte de iradiere.

Lumina UV poate cauza leziuni ale pielii şi retinei şi favorizează apariţia cancerului tegumentar.

Faza de creştere a microorganismelor influenţează eficacitatea iradierii cu UV. Celulele care cresc şi se multiplică sunt cele mai sensibile, iar endosporii sunt rezistenţi.

Lumina solară are efect letal asupra microorganismelor, datorită componentei UV, dar şi pentru că induce procesul de *fotooxidare*.

In procesul *fotooxidării*, energia luminoasă cu lungimea de undă mai mare decât a radiaţiei UV este absorbită de pigmenţi sau de alţi compuşi chimici ai celulei şi determină oxidarea letală a unor molecule de importanţă vitală. Procesul are loc numai în prezenţa O_2 atmosferic. Lumina solară poate inactiva prin fotooxidare, chiar sporii de *B. anthracis*, după expunere prelungită. In contrast, efectul letal produs de UV nu necesită prezenţa O_2.

In celula vegetativă se activează mecanisme de reparare a leziunilor induse de UV:

- *fotoreactivarea* este procesul în cursul căruia, în celulele iradiate cu UV şi expuse razelor de lumină cu lungimea de undă mai mică de 500 nm, se induc enzimele de fotoreactivare, ce monomerizează dimerii de timină şi o mare proporţie din celulele iradiate rămân viabile;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- *excizia secvețelor dimerice* și a nucleotidelor învecinate. Procesul este catalizat de o endonuclează care incizează ADN, o exonuclează care excizează secvența, o ADN-polimerază care repară secvența prin încorporarea corectă a bazelor și o ADN-ligază, care reunește cele două capete ale catenei reparate;
- *repararea la întuneric* prin recombinare postreplicativă. Replicarea ADN progresează până ajunge la un dimer neexcizat. Pe catena opusă dimerului, este lăsată o discontinuitate și replicarea este reluată la un nou situs de inițiere, situat cu 80–1000 de baze în aval. Asemenea discontinuități apar pe ambele catene nou sintetizate, deoarece dimerii de T se găsesc pe ambele catene parentale. Discontinuitățile vor fi reparate prin inserția recombinatorială a ADN parental din catena opusă.

Radiațiile corpusculare (alfa, beta, protonii), ca și radiațiile electromagnetice gama și X sunt ionizante. Radiațiile alfa sunt atomi de He, cu forță scăzută de penetrație și nu se folosesc pentru sterilizare. Radiațiile beta sunt electroni cu viteză înaltă. Razele gama și X au lungimi de undă foarte mici și sunt generate de surse radioactive (Co^{60}). Au capacitate considerabilă de penetrare. Radioizotopii sub forma Co^{60} și electronii accelerați sunt sursele principale de radiații ionizante. Unitatea de radiație folosită în microbiologie a fost *radul*, care cuantifică energia absorbită din radiația ionizantă, de materia prin care trece radiația. Unitatea de măsură mai modernă a radiației este *gray* (Gy), definită ca un aport de 1 J Kg^{-1} energie în țesut. 1 Gy = 100 razi.

Cel mai rezistent organism la radiațiile ionizante este *Deinococcus radiodurans*.

Radiațiile ionizante scot electronii din atomii prin care trec. Toate schimbările chimice ce au loc în celula bacteriană se datorează electronilor mobilizați, care inițiază un lanț de reacții chimice. Ionizarea se produce mai întâi în apa din citosol și rezultă radicali foarte reactivi cu viață scurtă: OH^- și H^+. Se generează astfel coloanele de ionizare, prin deplasarea în cascadă a electronilor de pe orbitele lor, care determină alterarea sau distrugerea unor molecule esențiale pentru celulă. Se produc ruperi monocatenare sau dublu catenare ale moleculei de ADN și stoparea sintezelor și diviziunii celulare.

Datorită efectului lor specific, aceste radiații sunt denumite generic ca *ionizante*, spre deosebire de alte radiații (de exemplu, UV) care nu transformă atomul în ion, deoarece nu pot să-i smulgă un electron, ci determină numai "excitarea" atomului, adică trecerea lui la un nivel energetic superior, prin deplasarea unui electron satelit pe o orbită mai îndepărtată de nucleul atomic.

Razele X sunt cele mai active, în special cele "moi", cu un intens efect bactericid. Dozele neletale opresc diviziunea și produc modificări de ordin morfologic și fiziologic.

Razele X "tari", ca și razele alfa și beta, care sunt mai penetrante, deci mai puțin absorbite, au un efect antimicrobian mai atenuat.

Radiațiile beta și X se folosesc pentru sterilizarea conservelor alimentare, deși le conferă un miros particular, care poate fi numai parțial îndepărtat. De asemenea, ele sunt folosite pentru inactivarea vaccinurilor, având avantajul că nu modifică structura chimică și antigenică a produsului tratat. Rezistența la iradiere este mult mai mare la microorganisme decât la mamifere. Astfel, în timp ce doza mortală pentru om este de circa 500 r, pentru *E. coli* este de 10 000 r, pentru levuri este 30 000 r, iar pentru *Paramecium*, de 300 000 r. S-au izolat bacterii viabile din apa de răcire a unei pile atomice, care primise 100 milioane r, într-un interval de 8 ore.

Starea ADN în celulă este importantă în raport cu sensibilitatea la iradiere. Sporii sunt mai rezistenți decât celulele vegetative, deoarece, probabil conțin substanțe radioprotectoare, învelișul sporal pare a fi protector, iar ADN sporal se găsește într-o stare mai rezistentă la rupere.

Unele microorganisme au o rezistență deosebită la radiația ionizantă și la UV, deoarece posedă enzime capabile să repare avaria ADN. Mecanismele reparatorii s-au studiat la *D. radiodurans* și la *E. coli*, la care funcționează mecanisme rapide de recombinare reparatorie, codificate de *gene rec* multiple (A, B, C).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acţiunea laserului

Laserul este un fascicul foarte concentrat de cuante luminoase sau fotoni, generat de obicei în interiorul unui cristal de rubin (cristal de oxid de aluminiu, în care sunt dispersaţi atomi de crom), ca urmare a excitaţiei atomilor de crom din cristal, podusă prin modificarea stării energetice sub acţiunea luminii emise de o lampă cu xenon (blitzul fotografilor).

Denumirea de *laser* vine de la iniţialele cuvintelor engleze care îl definesc: *l*ight *a*mplification by *s*timulated *e*mission of *r*adiation (amplificarea luminii prin emisie stimulată de radiaţii).

Spre deosebire de o sursă de lumină de tipul becului electric (cu lumină incandescentă), care emite lumină "incoerentă" sub formă de radiaţii "dispersate" şi de numeroae lungimi de undă diferite, laserul emite o lumină "coerentă", sub forma unui fascicul de radiaţii foarte apropiate între ele, cu o lungime de undă practic uniformă, cuprinsă între 3000 şi 9000 A°. Datorită proprietăţilor sale particulare, laserul poate acţiona extrem de intens şi foarte localizat, concentrând o cantitate enormă de energie, pe o suprafaţă infimă, strict circumscrisă. Aplicat asupra microorganismelor, laserul determină distrugerea lor instantanee şi de aceea poate fi folosit pentru sterilizarea unor medii care se degradează prin expunere la temperaturi ridicate.

Acţiunea ultrasunetelor

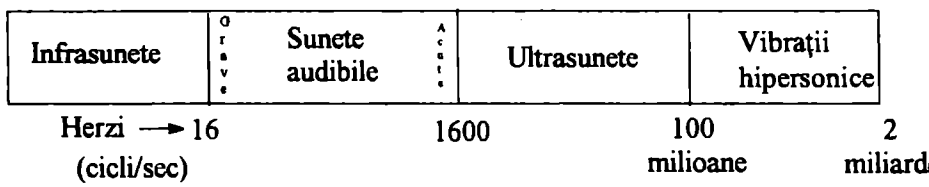
Dintre diferitele vibraţii mecanice, infrasunetele, care sunt neaudibile şi sunetele percepute de urechea umană (16-16 000 herzi) nu influenţează microorganismele. Vibraţiile ultrasonice şi cele supersonice produc moartea lor prin ruperea pereţilor celulari şi dezintegrarea structurilor intracelulare.

Eficienţa vibraţiilor sonice depinde mai mult de amplitudinea decât de frecvenţa lor. Ca atare, vibraţiile cu frecvenţă relativ joasă, dar cu intensitate mare sunt mai eficiente decât cele cu frecvenţă înaltă şi intensitate mică.

Sensibilitatea bacteriilor la ultrasunete variază cu specia şi, pe de altă parte, este mult mai mare la formele vegetative, decât a sporilor.

Moartea şi liza bacteriilor se datorează fenomenului de *cavitaţie*: pereţii celulari sunt intens bombardaţi de bule foarte mici de gaz, care se formează în lichidul de suspensie, ca rezultat al agitaţiei produsă de vibraţiile cu frecvenţă înaltă (ultrasonice şi hipersonice).

Acţiunea ultrasunetelor este folosită în practică pentru dezintegrarea celulelor bacteriene, separarea enzimelor sau altor constituienţi chimici sau antigenici, ca şi pentru sterilizarea anumitor produse.



ACŢIUNEA SUBSTANŢELOR CHIMICE ASUPRA MICROORGANISMELOR

Substanţele chmice din compoziţia unui mediu de creştere a microorganismelor pot exercita, în funcţie de natura şi concentraţia lor, trei tipuri de efecte asupra acestora:

- *favorizarea* dezvoltării şi multiplicării celulare, prin aportul substanţelor nutritive şi realizarea echilibrelor fizico-chimice necesare;
- un efect *microbiostatic*, prin blocarea potenţial reversibilă a proceselor de multiplicare celulară;
- un efect *microbicid*, prin alterarea profundă şi ireversibilă a unor procese metabolice esenţiale.

Particularităţile fiziologice ale microorganismelor influenţează acţiunea substanţelor chimice. De exemplu, CO_2 şi H_2S sunt toxice pentru majoritatea microorganismelor aerobe, al

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

căror metabolism respirator îl inhibă, dar pentru unele specii bacteriene, aceste substanţe reprezintă o sursă de energie.

Una şi aceiaşi substanţă poate acţiona în moduri diametral opuse, în funcţie de concentraţia ei: în concentraţie de 1%, zaharoza este o bună sursă de carbon şi energie, iar la concentraţia de 40% are efect bacteriostatic.

Substanţele folosite în metabolismul microorganismelor au rolul de surse de carbon, de azot şi de energie sau acţionează ca factori de creştere.

La concentraţii foarte mici ale unei substanţe nutritive în mediu, creşterea bacteriană este foarte slabă, dar se intensifică odată cu creşterea concentraţiei substanţei nutritive, până când aceasta atinge un nivel prag, după care, rata de creştere a populaţiei celulare devine constantă, independentă de concentraţia substanţei nutritive.

Când concentraţia substanţei atinge limita de toleranţă pentru celulă, se produce inhibiţia creşterii celulare, iar dincolo de această limită, substanţa nutritivă poate avea un efect bactericid.

Unele substanţe exercită efecte de chimiotaxie sau chimiotropism pozitiv, fiind *atractante* pentru microorganisme, în timp ce altele exercită un chimiotactism negativ asupra celulelor, efectul lor fiind *repelent*.

Efectele dăunătoare ale unor compuşi chimici pot fi de tip *microbiostatic*, determinând inhibiţia procesului de multiplicare, dar bacteriile rămân viabile şi îşi reiau creşterea şi multiplicarea după ce sunt transferate pe medii adecvate. Alteori, compuşii chimici au efect *microbicid*, adică determină moartea microorganismelor expuse.

Impărţirea substanţelor chimice în *bacteriostatice* şi *bactericide* este arbitrară, deoarece o substanţă poate fi bacteriostatică la concentraţie mică sau când acţiunea ei este de scurtă durată, dar poate fi bactericidă la concentraţie mare sau după acţiunea prelungită a unei concentraţii mici.

Caracterul bacteriostatic sau bactericid este dependent de următoarele două criterii:

- concentraţia la care se manifestă un anumit efect;
- timpul de acţiune pentru producerea efectului.

O substanţă este *microbicidă* (bactericidă, fungicidă) dacă efectul ei se produce într-un interval scurt de timp şi se manifestă la concentraţii foarte mici şi este *microbiostatică*, dacă efectul ei rămâne ca atare şi la concentraţii relativ mari de substanţă activă, iar rata efectului microbicid este foarte scăzută, astfel încât cel puţin o parte din celule pot supravieţui timp foarte îndelungat.

Multe substanţe cu efect bactericid la concentraţii înalte, sunt bacteriostatice la concentraţii mici.

In practică, în afara celor doi termeni se folosesc denumirile de *antiseptice* şi *dezinfectante*.

Antisepticele sunt substanţe chimice care, aplicate pe ţesuturile vii impiedică creşterea şi multiplicarea microorganismelor existente. Sunt relativ netoxice şi pot fi aplicate pe ţesuturi umane şi animale.

Termenul de *dezinfectant* este restrâns la substanţele cu efect microbicid rapid, la concentraţii mici. Ele se aplică pe obiecte neanimate, în scopul distrugerii microorganismelor contaminate. Cele mai multe substanţe dezinfectante sunt toxice şi nu pot fi administrate la om şi la animale.

Majoritatea substanţelor dezinfectante acţionează fie prin dizolvarea lipidelor din membrana citoplasmatică (detergenţi, solvenţi lipidici), fie prin modificări asupra proteinelor, acizilor nucleici etc.

Mecanisme de acţiune a substanţelor antibacteriene

Efectele nocive ale substanţelor antibacteriene se exercită pe mai multe căi:

- prin modificări de permeabilitate la nivelul peretelui celular şi membranei citoplasmatice;
- prin denaturarea unor constituienţi celulari esenţiali (proteinele);
- prin blocarea grupărilor funcţionale active ale enzimelor şi interferenţa cu metabolismul producător de energie;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- inhibiţia competitivă prin analogie sterică, a reacţiilor de biosinteză.

Uneori, aceiaşi substanţă îşi poate exercita acţiunea, pe una sau pe mai multe căi, dar una dintre acestea reprezintă calea principală de acţiune.

Substanţe antibacteriene active prin modificări de permeabilitate

Substanţele din această categorie (săpunurile, detergenţii) produc modificări fizico-chimice, care duc la pierderea permeabilităţii selective a membranelor celulare, astfel încât membrana citoplasmatică nu mai reţine în interiorul celulei, moleculele utile (aminoacizi, nucleotide, coenzime, ioni) şi nici nu poate opri pătrunderea din exterior a unor substanţe nocive.

Săpunurile îşi datorează efectul antimicrobian, acţiunii acizilor graşi nesaturaţi (oleic, linoleic, linolenic) din compoziţia lor. Acţiunea lor se exercită asupra constituienţilor lipidici ai membranelor celulare, care astfel devin mai permeabile. Datorită capacităţii lor emulsionante, săpunurile determină, prin spălare, o reducere masivă a numărului microorganismelor pe suprafaţa tegumentului.

Detergenţii sunt compuşi organici tensioactivi, obţinuţi prin sinteză chimică, din materii prime derivate din petrol. Molecula lor este asemănătoare aceleia a săpunurilor, dar au proprietăţi fizice şi chimice superioare.

Molecula agenţilor tensioactivi este asimetrică: conţine o regiune hidrofilă şi una hidrofobă (lipofilă sau liposolubilă). Molecula detergenţilor se leagă atât de apă, cât şi de moleculele organice nepolare. Molecula amfipatică a detergenţilor se orientează cu capătul hidrofob, spre materialul organic, iar capătul hidrofil spre apă.

Efectul detergenţilor este udarea, desorbţia, emulsionarea, suspensionarea şi stabilizarea particulelor dizlocate de pe o suprafaţă. Rezultatul este detergenţa (sau curăţirea). La contactul cu o suprafaţă lipidică sau cu interfaţa ulei-apă, moleculele detergentului se adsorb pe această suprafaţă, prin grupările lor hidrofobe, iar cele hidrofile rămân în apă. Astfel orientate, moleculele detergentului formează un strat (o soluţie) de continuitate între cele două medii insolubile (lipide-apă), ceea ce determină efectul de "udare", ca rezultat al scăderii tensiunii superficiale.

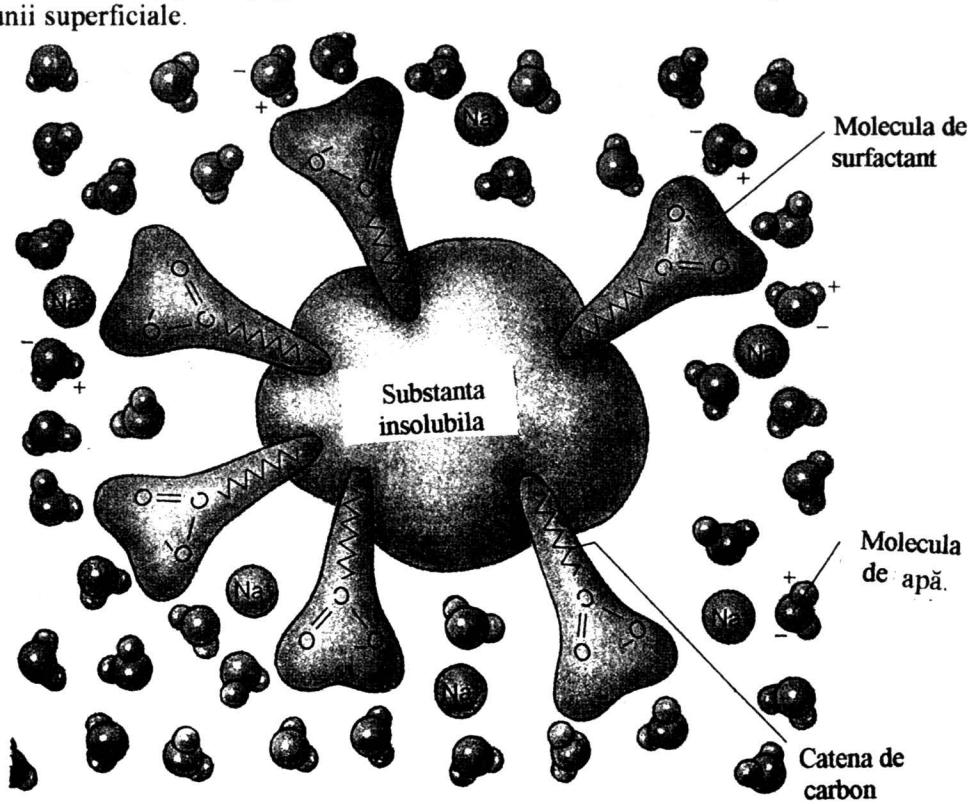


Fig.79. Ilustrarea schematică a mecanismului de acţiune a unui surfactant. Molecula de surfactant este ionizată în ionul de Na^+ şi catena de C, care realizează contactul cu o substanţă insolubilă (de exemplu, o moleculă lipidică. Celălalt capăt al agentului tensioactiv are un grup COO^- (oxigenul are sarcină negativă). Sarcinile negative atrag sarcinile pozitive ale moleculei de apă, astfel încât molecula insolubilă devine indirect legată de apă şi poate fi îndepărtată de pe substrat (după Black, 1996).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După natura lor chimică, detergenţii sunt de patru tipuri: *cationici, anionici, neionici* şi *amfoterici*. Cei neionici nu au calităţi dezinfectante, iar uneori pot chiar să favorizeze creşterea bacteriilor şi fungilor.

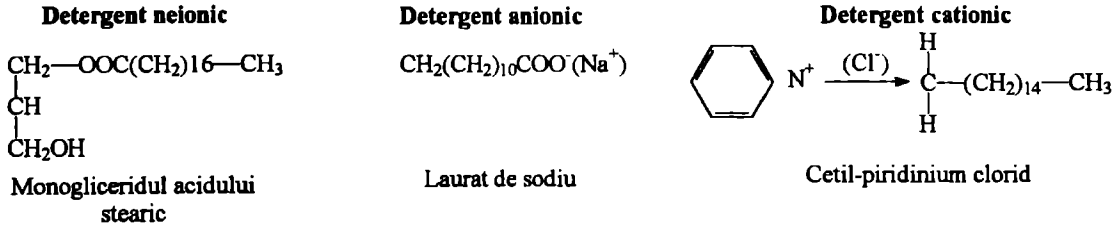


Fig. 80. Structura moleculară a unor dezinfectanţi.

Detergenţii anionici sunt săruri de Na şi K ale acizilor graşi superiori. Au efect bactericid scăzut, deoarece prin disociere eliberează un anion organic, cu toxicitate redusă, respins de sarcina netă negativă a suprafeţei bacteriene. Sunt mai eficienţi faţă de bacteriile Gram negative.

Detergenţii cationici (Cetavlon, Cetazol, Bromocet) sunt săruri de amoniu quaternar, care conţin patru grupări organice legate de un atom de azot. Prin disociere, ei eliberează un cation organic toxic. La contactul cu un detergent cationic, bacteriile îşi pierd sarcina electronegativă, prin adsorbţia ionilor pozitivi. Substanţele lipidice din peretele celular şi cele din membrană, sunt solubilizate. Structurile periferice îşi pierd rigiditatea, elasticitatea şi semipermeabilitatea. Numeroşi constituienţi citoplasmatici părăsesc celula, iar substanţa activă pătrunde în interior şi denaturează proteinele.

Detergenţii cationici sunt bactericizi faţă de toate categoriile de bacterii, chiar şi faţă de *M. tuberculosis*, deoarece dizolvă învelişul lipidic al suprafeţei lor. Eficienţa lor este diminuată de materialele fibroase, de apă, de ionii de Ca^{2+} şi Mg^{2+}. Oxidează obiectele de metal, dacă nu se adaugă un agent antioxidant (nitritul). Viabilitatea sporilor nu este afectată. Nu sunt toxici pentru organismul uman şi nu irită ţesuturile. Se folosesc ca antiseptici tegumentari. Acţiunea lor este neutralizată de săpunuri şi fosfolipide.

Detergenţii neionici (polieteri şi esteri poliglicerici) nu au acţiune bactericidă. Adăugaţi în mediile nutritive, sunt chiar metabolizaţi de unele microorganisme. Unii dintre ei (Tween 80) sunt folosiţi ca agenţi de dispersare ai celulelor bacteriene, pentru a favoriza creşterea şi multiplicarea lor. Concentraţiile mici de polisorbat (Tween) modifică permeabilitatea membranei externe a bacteriilor Gram negative.

Agenţii amfoterici cumulează proprietăţile detergente ale compuşilor anionici, cu proprietăţile antimicrobiene ale compuşilor cationici. Activitatea lor rămâne constantă la o variaţie largă de pH. Din această categorie fac parte compuşii din seria Tego.

Substanţe care acţionează prin denaturarea proteinelor

Substanţele din această categorie produc modificări fizico-chimice ale coloizilor citoplasmatici, stopează activitatea enzimelor şi precipită sau coagulează proteinele celulare.

Fenolul (acidul carbolic) este cel mai vechi dezinfectant cunoscut (Lister l-a folosit in 1867). La concentraţii mici este bactericid, deoarece produce denaturarea şi chiar precipitarea proteinelor celulare. Este iritant şi produce coagularea proteinelor tisulare. Aceleaşi efecte le produc şi derivaţii săi (crezolul, crezil-acetatul).

Fenolul şi crezolii au proprietăţi analgezice. Se folosesc sub formă de spray ca antiseptice şi analgezice pe membranele mucoase (ale urechii, nasului, gâtului). Sunt foarte stabili la încălzire şi uscare şi îşi păstrează activitatea în prezenţa materialului organic. Faţă de sporii bacterieni au o eficienţă moderată.

In diluţie de 5%°, fenolul este folosit ca prezervant pentru diferite preprate biologice. Prin convenţie internaţională, activitatea fenolului este considerată ca *etalon,* în raport cu care se apreciază activitatea antibacteriană a diferitelor substanţe.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

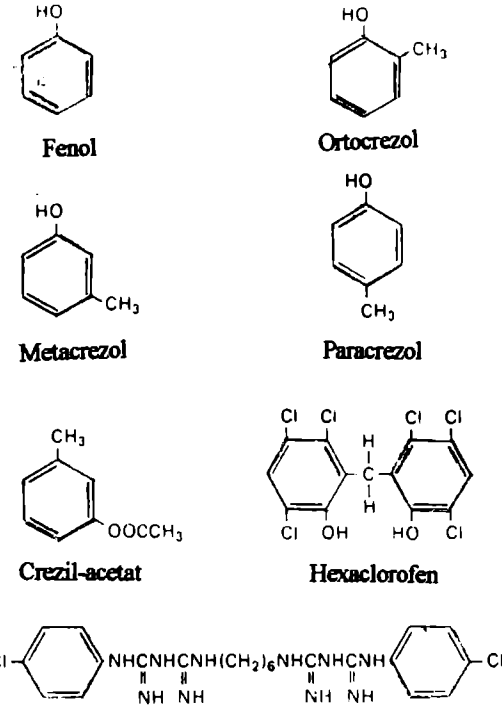
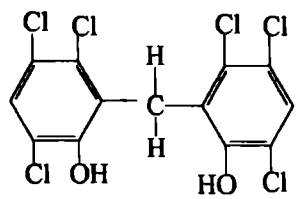


Fig. 81. Structura agenţilor antimicrobieni care aparţin grupului fenolic.

Fenolii sunt mai activi în amestec cu săpunurile, care măresc solubilitatea lor şi favorizează penetrarea în substrat.

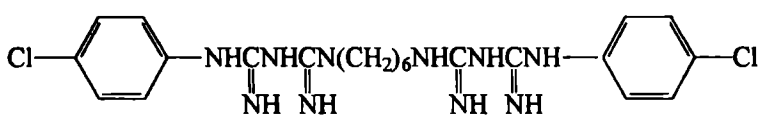
Adăugarea unui halogen (clor) sau a unui compus organic stimulează activitatea microbicidă a fenolilor.

Hexaclorofenul (difenol halogenat) este bacteriostatic la diluţii foarte mari. In combinaţie cu un săpun este un dezinfectant eficace al pielii. Dacă este absorbit pe cale tegumentară, este toxic. Nu are miros iritant, este un bun deodorant, ceea ce explică utilizarea sa ca deodorant comercial şi pentru producerea săpunurilor, înainte de a fi interzis, datorită neurotoxicităţii la copii.



Hexaclorofenul

Clorhexidenul este un înlocuitor eficient al hexaclorofenului.



Esterii alkilaţi ai acidului hidroxibenzoic sunt conservanţi ai alimentelor şi medicamentelor. Nu sunt toxici, deoarece sunt hidrolizaţi rapid.

Evaluarea potenţialului antibacterian al agenţilor chimici

Potenţialul sau eficienţa unui agent chimic antimicrobian este influenţată de temperatura, pH, concentraţie şi timpul de acţiune.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Creşterea temperaturii cu 10° dublează rata reacţiilor chimice şi măreşte potenţialul agentului chimic.

La o valoare a pH-ului care măreşte gradul de ionizare a unui agent chimic creşte şi capacitatea sa de a penetra în celulă. Valoarea pH poate altera chiar conţinutul celulei.

Concentraţia influenţează decisiv efectele agentului antibacterian. Concentraţiile mari pot fi bactericide, iar cele mici pot fi bacteriostatice. Alcoolul etilic şi izopropilic sunt excepţii notabile de la regula concentraţiilor. Ei sunt mai activi la concentraţia de 70% decât la concentraţii mai mari. Alcoolii acţionează prin coagularea (denaturare permanentă) a proteinelor, iar apa este necesară reacţiei de coagulare. Amestecul alcool-apă în proporţia 70% penetrează mai profund decât alcoolul pur, în materialul supus dezinfectării.

Coeficientul fenolic

Efectul dezinfectant al fenolului este unitatea etalon cu care se compară alţi dezinfectanţi, în aceleaşi condiţii de acţiune. Comparaţia se exprimă în *coeficientul fenolic* (CF).

Microorganismele test pentru determinarea coeficientului fenolic sunt *S. typhi* şi *S. aureus*. Un dezinfectant care are CF egal cu 1 are aceiaşi eficienţă antibacteriană ca şi fenolul, iar un CF mai mic decât 1 semnifică o eficienţă mai scăzută.

Coefientul fenolic se determină astfel

- se prepară câteva diluţii ale agentului chimic şi se repartizează volume egale în tuburi test;
- se prepară un set identic de tuburi test cu diluţii de fenol;
- ambele seturi de tuburi se aduc la acelaşi nivel termic prin încălzire în baie de 20°, timp de 5 minute;
- în fiecare tub din cele două seturi se transferă 0,5 ml din cultura unui microorganism test (*S. typhi* sau *S. aureus*);
- după 5, 10, 15 minute se transferă, cu o ansă calibrată, un volum din fiecare tub, într-un tub cu bulion nutritiv. Tuburile se incubă;
- după 48 de ore se evaluează turbiditatea tuburilor inoculate şi se găseşte cea mai mică concentraţie (cea mai mare diluţie a agentului care a omorât toate organismele în 10 minute, dar nu în 5 minute);
- se stabileşte raportul diluţiei agentului chimic, la diluţia fenolului, ce are acelaşi efect.

De exemplu, dacă diluţia 1/10 a unui agent chimic are acelaşi efect ca şi diluţia 1/100 a fenolului, CF al agentului chimic este 10.

Determinarea CF este o modalitate adecvată de a aprecia eficienţa agenţilor chimici derivaţi din fenol, dar este mai puţin adecvată pentru alţi agenţi dezinfectanţi. Evaluarea potenţialului antibacterian a unui agent chimic se poate face mai simplu, prin metoda discurilor de hârtie de filtru:

- fiecare disc de hârtie este îmbibat cu soluţia unui agent chimic diferit;
- discurile se aşează pe suprafaţa unei plăci cu mediu agarizat, inoculat cu un organism test;
- fiecare organism test se însămânţează pe o placă diferită;
- după incubare, efectul inhibitor al unui agent chimic asupra organismului se identifică printr-o zonă clară de inhibiţie a creşterii în jurul discului.

Diametrul zonei de inhibiţie a creşterii este proporţional cu potenţialul antibacterian al agentului chimic.

Acizii şi alcalii. Cele mai multe bacterii pot fi cultivate în medii al căror pH este cuprins între 6 şi 9, diferenţa de concentraţie a ionilor de H fiind echivalentă cu diferenţa de la 1 la 1000. Toleranţa la variaţia largă a pH se datorează faptului că bacteriile sunt puţin permeabile pentru ionii de H^+ şi OH^-, ceea ce le permite menţinerea neutralităţii interne. Aşa se explică faptul că, deseori, tocmai acizii slabi şi bazele slabe, care se disociază puţin au un efect antibacterian evident. Efectul lor nu se datorează ionilor de H^+ şi OH^-, ci este legat de prezenţa unui număr mare de molecule nedisociate, acizi sau baze care pot pătrunde în celulă mai uşor decât ionii corespunzători. De aceea, activitatea lor antimicrobiană, este dependentă de pH-ul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mediului. Aşa se explică de ce, într-un mediu uşor acid, acidul acetic este toxic pentru bacterii, pe când HCl are un efect antibacterian slab. La un pH relativ scăzut al mediului, acizii slabi, aflaţi sub forma nedisociată pot pătrunde în celula bacteriană şi îi modifică pH, în timp ce acizii tari, intens disociaţi rămân în afara ei. In mediul neutru sau uşor alcalin, moleculele de acid acetic sunt aproape complet ionizate (disociate), ceea ce le îngreuiază accesul în celulă şi, ca urmare, toxicitatea lor este anulată. Acelaşi mod de comportare este caracteristic şi bazelor slabe: NH_3 este toxic în mediu slab alcalin şi inofensiv pentru bacterii, în mediu neutru sau slab acid.

Pentru acizii tari, eficienţa acţiunii antimicrobiene este proporţională cu concentraţia ionilor de H^+ în soluţie.

HCl este sporicid şi se foloseşte pentru dezinfectarea pieilor de animale, infectate cu *B. anthracis*.

Unele bacterii sunt acidotolerante şi chiar acidofile. *Lactobacillus* sp. se dezvoltă la pH 4, iar *Thiobacillus thiooxidans*, chiar în prezenţa H_2SO_4, 0,1 M.

Acţiunea antimicrobiană a acizilor este folosită în practică pentru conservarea alimentelor cu acid acetic 5%, cu sărurile acidului propionic (CH_3- CH_2 – COOH), parahidrobenzoic, benzoic, sorbic sau cu esterii metil, etil, propil, butil, ori prin fermentaţie lactică naturală.

Micobacteriile sunt relativ rezistente la acţiunea acizilor si alcalilor, practica obişnuită fiind lichefierea sputei înainte de cultivare, prin expunere pentru 3o de minute, la NaOH 1N sau H_2SO_4, 1N.

Acidul boric este un antiseptic de valoare medie.

Activitatea antimicrobiană a alcalilor tari este dependentă de concentraţia ionului OH^- în soluţie. NaOH are proprietăţi alcaline puternice: la concentraţia de 5% omoară celulele vegetative, iar la concentraţii mai mari omoară sporii de *B. anthracis*.

$Ca(OH)_2$ rezultă din reacţia $CaO + H_2O$. Soluţia 20% de $Ca(OH)_2$ omoară majoritatea bacteriilor nesporulate.

Alcoolii sunt cei mai utilizaţi agenţi chimici pentru dezinfecţie. Ei sunt activi prin efectul denaturant asupra proteinelor şi prin solubilizarea lipidelor. Produc ruperea membranelor şi inactivarea enzimelor. Omoară bacteriile nesporulate, inclusiv pe cele acidorezistente.

Efectul dezinfectant al alcoolilor creşte odată cu lungimea catenei (până la 8-10 atomi de C), după care solubilitatea în apă scade progresiv. Cei mai folosiţi alcooli sunt CH_3OH, C_2H_5OH şi $CH_3CHOHCH_3$ (izopropanol). Ultimul este un bactericid mai eficace, la concentraţia de 99%.

Etanolul se foloseşte în soluţii apoase. Cele mai eficiente sunt cele cu concentraţia de 60-70%. Prezenţa apei este esenţială pentru activitatea antimicrobiană a etanolului. Concentraţiile mai mari de 90% şi mai mici de 5% sunt relativ ineficiente ca agenţi dezinfectanţi.

Acţiunea lor dezinfectantă, ca şi efectul denaturant asupra proteinelor implică participarea apei. Eficienţa acţiunii lor scade în prezenţa materiei organice. Expunerea timp de o oră este letală pentru formele vegetative, dar nu afectează viabilitatea sporilor. Alcoolii se folosesc pentru dezinfectarea tegumentului. Contactul de scurtă durată nu are efect sterilizant, ci numai reducerea populaţiei bacteriene.

Fenil-etanolul este activ faţă de bacteriile Gram negative şi se foloseşte drept conservant al soluţiilor de uz oftalmic.

Alţi solvenţi organici (*eter, benzen, acetonă*) omoară bacteriile dar nu sunt agenţi dezinfectanţi. Adăugarea câtorva picături de *toluen* sau *cloroform* în soluţii apoase, inhibă dezvoltarea fungilor şi bacteriilor. *Glicerolul* este bacteriostatic la concentraţii de peste 50%. Este folosit pentru conservarea vaccinurilor, deoarece nu este iritant pentru ţesuturi.

Substanţe care acţionează prin interferenţă cu grupările active ale proteinelor-enzime

Unele substanţe acţionează direct asupra unor grupări reactive (amino, carboxil, sulfhidril, amido, indol) din structura enzimelor, combinându-se cu ele şi blocând astfel sau modificând activitatea enzimatică. In funcţie de stabilitatea legăturii formate între aceste

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

substanţe şi grupările reactive ale enzimelor, efectul este microbiostatic sau microbicid, iar reacţia este reversibilă sau ireversibilă.

Formaldehida (HCHO) şi *glutaraldehida* ($OCH(CH_2)_3CHO$) omoară celulele prin denaturarea proteinelor. Ele înlocuie atomii labili de H din grupările $-NH_2$, –OH, –COOH, –SH ale proteinelor şi formează punţi metilenice ($R–CH_2–R$), care leagă, în general ireversibil, moleculele proteice şi le inactivează. Reacţiile formaldehidei sunt, parţial, ireversibile.

Formaldehida se foloseşte în soluţie apoasă (37%) sau 20% în alcool 65-70%, sau prin vaporizare la cald, pentru sterilizarea suprafeţelor uscate. In concentraţie de 4%° este folosită ca prezervant pentru vaccinuri şi preparate de diagnostic.

Soluţiile de formaldehidă, apoase sau alcoolice sunt netoxice şi neiritante. Ele omoară celulele vegetative în 5 minute, *M. tuberculosis* – în 10 minute, sporii în 3-12 ore şi inactivează virusurile în 10 minute.

Etilen-oxidul ($CH_2–O–CH_2$) este cel mai folosit gaz sterilizant. Molecula de etilen-oxid înlocuie H din proteine, din acizii nucleici şi probabil din alte molecule. Legarea etilen-oxidului se numeşte alkilare şi efectul este blocarea grupărilor reactive ale macromoleculelor. Este solubil în apă şi foarte exploziv. Este folosit pentru sterilizarea gazoasă a obiectelor termosensibile: echipamente chirurgicale, lenjerie de spital. Are acţiune toxică remanentă (este vezicant).

Ionii unor metale grele (Hg, Ag, Cu, Zn, Fe) sunt toxici pentru microorganisme, datorită acţiunii lor oligodinamice, adică sunt activi la concentraţii foarte mici. Cu, Zn, Fe intră în componenţa unor enzime şi au rolul fiziologic de microelemente, dar la concentraţii supraoptimale, în compoziţia substanţelor antimicrobiene, ionii metalelor grele acţionează prin precipitarea enzimelor sau a altor proteine esenţiale ale celulei. Ionii metalici pot fi aşezaţi în serii cu activitate antimicrobiană descrescătoare: Hg, Ag, Zn, Cu. Sunt activi la concentraţii foarte mici (o parte la un milion), datorită afinităţii lor pentru grupările SH.

Hg este utilizat sub forma sărurilor anorganice ($HgCl_2$, sublimat coroziv, cu CF = 827 şi oxicianura de Hg) sau sub formă organică (mertiolat, mercurocrom).

Acţiunea sărurilor de Hg se datorează formării de mercaptide cu grupările –SH ale proteinelor. Iniţial, reacţia este reversibilă şi efectul este microbiostatic. Efectul $HgCl_2$ este neutralizat prin adăugarea în exces a compuşilor cu grupări –SH (glutation, tioglicolat). Din această cauză, utilizarea ei este considerată a fi perimată. După contactul prelungit sau prin utilizarea unor concentraţii mari de $HgCl_2$, reacţia devine ireversibilă şi efectul este microbicid. $HgCl_2$ este folosită curent în laborator, la concentraţii de 1/1000 până la 1/10 000, care omoară toate microorganismele. La diluţii mari (1/20 000 sau mai mari), efectul este bacteriostatic.

Compuşii organici cu Hg se folosesc pentru dezinfectarea rănilor superficiale şi pentru conservarea serurilor şi vaccinurilor.

Ionii de Ag au efect microbiostatic, la concentraţii foarte mici şi microbicid, la concentraţii mai mari. Se pare că unele proteine au afinitate mare pentru ionii de Ag şi îi fixează chiar la concentraţii mici. S-a evidenţiat că bacteriile omorâte sub acţiunea ionilor de Ag conţin în medie 10^6 ioni/celulă, ceea ce corespunde aproximativ numărului de molecule de proteine-enzime dintr-o celulă.

$AgNO_3$, în soluţie de 1% (Argyrol) se foloseşte pentru a inhiba posibilele infecţii gonococice ale ochiului la noul născut. Se instilează în ochi, imediat după naştere, deoarece infecţia nosocomială poate determina orbirea. In locul $AgNO_3$ s-a folosit penicilina, dar odată cu preponderenţa bacteriilor rezistente la penicilină, $AgNO_3$ a fost reintrodus în uz.

Zincul se foloseşte sub forma unui amestec al sării ($ZnCl_2$), cu acizi graşi cu lanţ lung. Se foloseşte ca pulbere antifungică sau ca unguent. $ZnCl_2$ este astringentă şi se utilizează în tratamentul leziunilor superficiale. Pasta de ZnO se foloseşte pentru tratamentul infecţiilor fungice şi bacteriene.

Acţiunea substanţelor dezinfectante asupra microorganismelor se desfăşoară ca un proces treptat, în cursul căruia, numărul bacteriilor viabile scade progresiv: în fiecare unitate de timp va fi distrus un procent constant din numărul celulelor viabile. Efectul antimicrobian este dependent de sensibilitatea microorganismului, de faza sa de creştere, de forma de existenţă (vegetativă sau spor), de natura şi concentraţia substanţei bactericide, de durata acţiunii ei, de compoziţia chimică a mediului şi de pH. Prezenţa unor substanţe organice supraadaugate, alcalinitatea şi temperaturile scăzute diminuă efectele toxice ale substanţelor chimice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Halogenii şi compuşii lor. Halogenii – clorul şi iodul se folosesc ca dezinfectanţi sub formă organică şi anorganică. Majoritatea compuşilor organici ai halogenilor are efect letal asupra celulelor, prin oxidarea proteinelor, ruperea membranelor şi inactivarea enzimelor.

Iodul se combină ireversibil cu proteinele, prin iodurarea tirozinei şi este un agent oxidant. Tinctura de iod (2-7%), adică iodul metalic (I_2), dizolvat în soluţie alcoolică concentrată de KI, este antiseptic şi se aplică pe suprafaţa pielii, înainte de procedeul chirurgical şi pe rănile mici. Este iritant şi poate determina chiar reacţii alergice.

Cel mai activ este iodul diatomic (I_2), având efect microbicid rapid faţă de bacterii, levuri, mucegaiuri, spori.

Folosirea iodului este limitată de toxicitate şi de culoare. De aceea se utilizează *iodofori,* sub forma soluţiilor în care iodul este solubilizat de agenţi tensioactivi: detergenţi neionici cu proprietăţi dezinfectante şi polivinil pirolidona, cu proprietăţi antiseptice. Iodul se leagă uşor cu aceşti compuşi organici, de unde este eliberat lent, fapt ce condiţionează o dezinfecţie eficientă. Iodoforii sunt microbicizi la variaţii mari de pH şi îşi păstrează activitatea în prezenţa materiei organice.

Clorul liber are culoare caracteristică (verde) şi miros pătrunzător. In oricare din variatele sale forme, clorul este deodorant şi dezinfectant.

Clorul este un agent bactericid foarte puternic (CF = 200). Adăugat în apă, clorul formează acidul hipocloros, produs instabil care degajă O_2 în stare născândă, un oxidant foarte puternic, după reacţiile:

$$Cl_2 + H_2O \rightleftharpoons HCl + HClO$$
$$2HClO \rightleftharpoons 2HCl + O_2$$

In soluţie apoasă (apa de clor), clorul este bactericid la concentraţia de 0,02%, după maxim 5 minute. Se foloseşte pentru tratarea apei potabile (clorinare), la concentraţia de 1-3 mg/l.

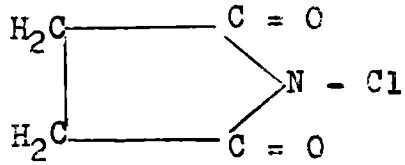
Clorul şi compuşii săi sunt inactivaţi în prezenţa materiei organice şi a catalizatorilor metalici.

Soluţiile de hipoclorit sunt folosite pentru dezinfectare şi ca deodorante. Sunt inofensive pentru ţesuturile umane, uşor de manevrat, incolore, dar decolorante. Se folosesc în spitale pentru dezinfectarea camerelor, a suprafeţelor, a instrumentelor nechirurgicale.

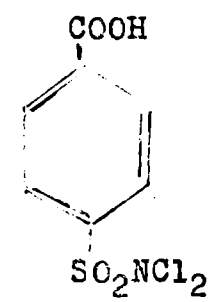
Cloraminele sunt derivaţi cloruraţi ai aminelor (R-NHCl). Sunt compuşi mult mai stabili decât hipocloriţii, cristalini, solubili în apă, cu care dau prin hidroliză, hipoclorit de sodiu şi anionul hipocloros. Sunt active la concentraţii de o,5-l,5%, exprimate în clor activ.

Câţiva compuşi organici cloruraţi se folosesc pentru dezinfectarea apei. Cel mai utilizat este compusul *halazon* sau acidul parasulfon-dicloraminobenzoic. La concentraţia de 4-8 mg/l dezinfectează, în 3o de minute, apa ce conţine bacili tifici.

Succin-clorimidul, in cantitate de 11,6 mg dezinfectează 1 litru de apă în 2o de minute. Aceste cloruri organice, stabile în formă de tabletă, devin active în contact cu apa. Sunt ineficiente faţă de chiştii de *Entamoeba hystolitica.*



Halazon (Acid parasulfon-diclor-aminobenzoic)



Succin-clorimid

Fig. 82. Compuşi organici cloruraţi, utilizaţi ca dezinfectanţi (halazon şi succinil-clorimid).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Alți agenți oxidanți. Permanganatul de potasiu ($KMnO_4$), în concentrație de 1:10 000 este un antiseptic puternic, dar acțiunea sa este neutralizată de prezența substanțelor organice.

Peroxizii. Peroxidul de H, perhidrolul sau apa oxigenată (H_2O_2) este un antiseptic eficient și netoxic. Molecula este instabilă și prin încălzire se descompune în H_2O și O_2, după reacția:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

In timpul generării O_2 se formează O_2^- (radicalul superoxid), în prezența ionilor de metal din citoplasmă. Radicalul O_2^- reacționează cu grupările încărcate negativ ale proteinelor și inactivează enzimele. Concentrația de 6-25% H_2O_2 se folosește pentru sterilizarea unor materiale (implante chirurgicale, lentile de contact). Nu are toxicitate remanentă. Concentrația de 0,1% H_2O_2 în lapte, la temperatura de 54° diminuă numărul total de bacterii cu 99,99%. La concentrația de 10%, distruge sporii și inactivează virusurile. Soluția comercială de 3% se folosește pentru dezinfecția rănilor, deoarece bacteriile anaerobe sunt foarte sensibile la prezența O_2.

Peroxidul de sodiu (Na_2O_2), ca pastă se folosește pentru tratamentul acneii.

Peroxidul de zinc (ZnO_2) se folosește în suspensie cu ZnO și $Zn(OH)_2$ pentru tratamentul infecțiilor tegumentare cu bacterii microaerofile și anaerobe.

Benzoil-peroxidul se folosește pentru tratamentul acneii și se adaugă în soluțiile de curățire a pielii.

Acidul peracetic ($CH_3 - CO - O - OH$) este un agent oxidant puternic și se folosește sub formă gazoasă pentru serilizarea camerelor pentru creșterea animalelor germ-free.

Coloranții antiseptici

O categorie specială de coloranți manifestă acțiune bacteriostatică: derivații acridinei și coloranții de rozanilină.

Acriflavina este un amestec format din doi derivați ai acridinei. Are toxicitate scăzută și nu sensibilizează tegumentul. Are un spectru larg de acțiune și se folosește pentru tratamentul infecțiilor tractului urinar. Mecanismul de acțiune pare să conste în capacitatea acridinelor de a se insera între nucleotidele moleculei de ADN.

Cristal-violetul este un derivat metilic al colorantului rosanilină. Este colorantul utilizat în reacția Gram, dar are și efect bacteriostatic asupra bacteriilor Gram pozitive.

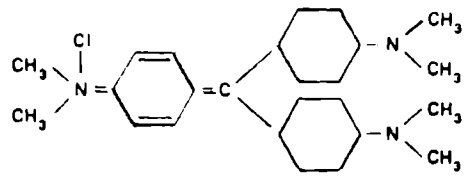


Fig. 83. Structura chimică a cristal-violetului (hexametil-pararosanilină).

Cristal-violetul a fost folosit pentru tratamentul vaginitei cauzată de *Trichomonas*. Agentul etiologic al candidozei vaginale, *Candida albicans* este foarte sensibil la acțiunea colorantului.

Mecanismul de acțiune a acestui compus față de bacteriile Gram pozitive, este foarte asemănător cu acela al penicilinei, adică constă în blocarea treptei finale a sintezei peretelui celular.

Quinonele sunt coloranți naturali, care conferă culoare multor forme de viață, plante și animale. Unele quinone sunt fungicide de importanță agricolă: cloranil și diclone.

Agenți chimioterapeutici

Creșterea unui organism depinde de integritatea aparatului sau enzimatic de sinteză. Mediul influențează creșterea celulelor, în primul rând prin alterarea activității enzimelor. Inhibiția activității enzimelor este o modalitate importantă de tratament al infecțiilor bacteriene.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Caracteristicile unui agent antimicrobian sunt următoarele:

- solubilitatea în fluidele organismului, pentru a fi transportate la situsul infecției. Chiar agenții care se administrează local trebuie să se dizolve în fluidele țesutului lezat, dar nu trebuie să se lege prea stabil de proteinele serice;
- toxicitatea selectivă: agenții chimioterapeutici trebuie să fie mai toxici pentru microorganisme decât pentru celulele gazdei. Idealul este să existe o diferență mare între concentrația minimă toxică pentru microorganisme și concentrația ce lezează celula gazdă;
- să-și păstreze toxicitatea standard și să nu devină mai toxic sau mai puțin toxic după interacțiunea cu substanțele nutritive, cu alte medicamente sau în condiții patologice (diabet, insuficiență renală etc.);
- să nu fie alergic pentru organismul gazdă;
- să fie stabil după administrare, adică să-și păstreze concentrația terapeutică constantă în sânge și în fluidele organismului. Să fie degradat și excretat lent;
- să nu inducă fenomenul de rezistență a microorganismelor;
- să fie stabil în condițiile păstrării (refrigerare, întuneric);
- să fie ieftin.

Principiul fundamental al chimioterapiei antiinfecțioase constă în utilizarea unor substanțe cu *toxicitate selectivă* care să stopeze creșterea și multiplicarea agentului patogen infecțios, dar să nu altereze funcționalitatea celulelor organismului uman și animal. Agenții chimioterapeutici interacționează selectiv cu sistemele metabolice active ale microorganismelor, dar nu cu acelea ale celulelor organismului gazdă.

Acțiunea selectivă înseamnă capacitatea unui agent chimic de a inhiba dezvoltarea microorganismelor (și prin extindere, a celulelor canceroase), la concentrații ce pot fi tolerate de organismul gazdă.

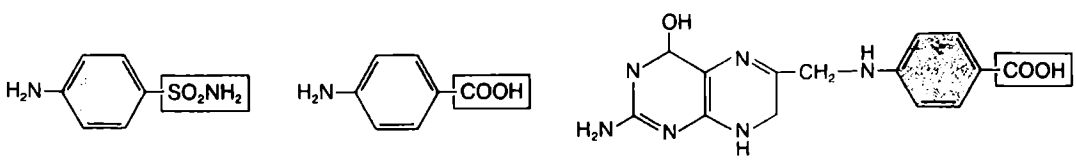
Conceptul terapiei a fost formulat de P. Ehrlich (1904). El a folosit un compus al arseniului (arsfenamina sau salvarsan) pentru tratamentul pacienților infectați cu *Treponema pallidum*, agentul sifilisului.

Agenți chimioterapeutici activi prin inhibiție competitivă

Sulfamidele sunt agenți chimioterapeutici foarte importanți din punct de vedere practic. Descoperirea lor are caracter empiric și pragmatic. Domagk (un cercetător german) a descoperit că *prontosilul* (un colorant roșu), deși *in vitro* nu are efecte inhibitorii, *in vivo* este foarte eficient față de *Streptococcus aureus*. Explicația este următoarea: în organism, molecula de colorant a fost scindată enzimatic și s-a eliberat o moleculă mică – *sulfanilamida* – foarte activă față de *S. aureus*, dar inactivă în forma legată de colorant.

Sulfamidele reprezintă un grup de substanțe microbiostatice, având ca prototip *sulfanilamida* (para-amino-benzen-sulfonamida).

Mecanismul acțiunii sulfamidelor a fost lămurit când Woods a demonstrat că acidul paraaminobenzoic (APAB) are o acțiune antagonistă față de aceste substanțe, în sensul că anihilează efectul lor antimicrobian: dublarea concentrației de inhibitor adăugat în mediu necesită dublarea concentrației de APAB, pentru a relua creșterea.



a. Sulfanilamida b. Acid para-aminobenzoic c. Acid folic

Fig. 84. Structura sulfanilamidei, analogul acidului paraamino-benzoic component al acidului folic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

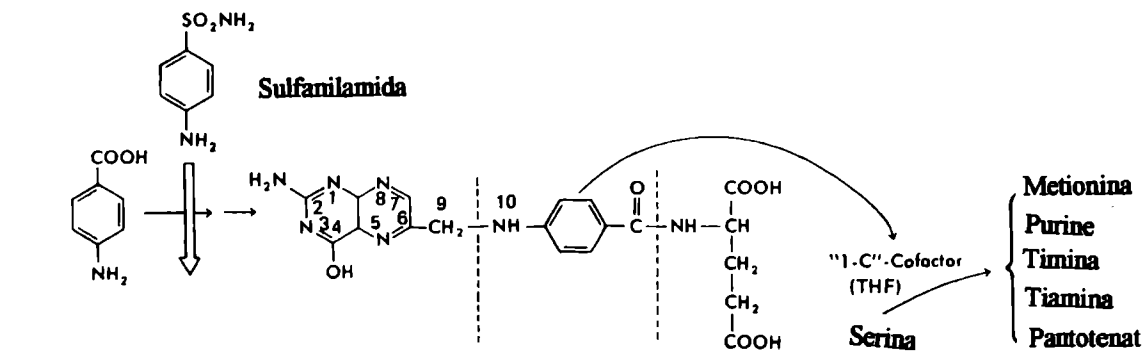
Acţiunea antagonistă a APAB nu este directă, ci se exercită prin intermediul metabolismului bacterian. APAB este un nutrient esenţial, fiind precursorul *acidului folic*, un factor de creştere esenţial pentru bacterii. Acidul folic şi formele sale reduse – acidul dihidrofolic şi tetrahidrofolic – transferă fragmente cu 1C derivate din serină, pentru sinteza metioninei, purinelor, timinei, tiaminei, pantotenatului.

Datorită marii asemănări a structurii chimice a celor două substanţe, între ele are loc un fenomen de competiţie pentru participarea la sinteza acidului folic. Enzima bacteriană implicată în conversia APAB la acid folic, adeseori "greşeşte" şi se combină cu sulfanilamida, în loc de APAB. Astfel, sinteza acidului folic şi toată calea metabolică dependentă de acidul folic este blocată. Sulfanilamida intră în competiţie cu APAB pentru situsul activ al enzimei. Acest tip de inhibiţie este reversibil: dacă sulfanilamida este îndepărtată, enzima funcţionează normal. Cu cât raportul moleculelor de sulfanilamidă/APAB este mai mare, cu atât inhibiţia metabolismului bacterian este mai amplă.

Deoarece metabolismul, în privinţa trăsăturilor sale esenţiale este acelaşi la toate bacteriile, rezultă că toate speciile utilizează acidul folic, chiar dacă nu toate îl pot sintetiza.

Sulfamidele sunt toxice pentru bacteriile capabile să sintetizeze acidul folic, pornind de la molecule mai simple. Bacteriile care nu sintetizează acidul folic, astfel încât acest factor trebuie sa fie furnizat ca atare, preformat în mediul nutritiv, nu sunt sensibile la sulfonamide.

Efectul sulfonamidelor este antagonizat necompetitiv de un amestec de intermediari ai căii acidului folic, adică efectul lor antagonic nu poate fi depăşit prin creşterea concentraţiei de sulfonamidă.



A c i d u l f o l i c
(Acidul pteroil-glutamic)

Fig. 85. Căile metabolice blocate de sulfonamide. Analogii acidului para amino-benzoic (APAB) blochează condensarea sa cu o pteridină pentru a forma dihidropteroatul. Acesta se condensează cu acidul glutamic pentru a forma acidul folic. Acidul folic, precum şi formele sale reduse (acidul dihidrofolic - DHF şi tetrahidrofolic - THF) suferă un ciclu de reduceri şi oxidări pentru reducerea şi transferul fragmentelor cu un atom de C derivate din serină, rezultând metionină, purine, timină, tiamină, acid pantotenic. Trimetoprimul este un analog al DHF, blocând reducerea sa la THF. Trimetroprimul şi sulfonamidele acţionează la nivelul unor trepte diferite ale aceleiaşi căi (după Davis, 1990).

Sulfanilamida inhibă sinteza acidului folic prin inhibiţie competitivă cu dihidropteroic acid-sintetaza. Enzima catalizează condensarea dihidropteridinei cu acidul para-aminobenzoic, în stadiul timpuriu al sintezei acidului folic. Deoarece acidul folic îşi păstrează activitatea în celulele bacteriene, efectul inhibitor al sulfonamidelor devine evident după câteva generaţii de celule, când cantitatea de acid folic s-a diminuat sub un nivel critic, prin distribuţie în celulele fiice. Toxicitatea selectivă derivă din faptul că bacteriile sensibile sintetizează acidul folic *de novo*, iar omul absoarbe cofactorul preformat.

Cele mai cunoscute sulfonamide sunt *sulfadiazina* si *sulfametoxazol* (cotrimoxazol), bine absorbite după administrare orală şi excretate în urină.

Acţiunea derivaţilor sulfanilamidei este bacteriostatică faţă de bacteriile Gram pozitive şi Gram negative. Se folosesc în tratamentul infecţiilor vezicii urinare, cauzate în marea lor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

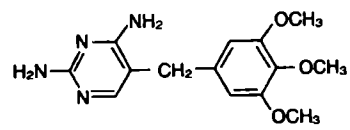
majoritate de *E. coli*. Circa 5% dintre pacienţi suferă efecte secundare, mai ales reacţii alergice, cu febra şi eritem tegumentar.

Rezistenţa bacteriană la sulfonamide este mediată de plasmide, dar şi de gene cromosomale, prin hiperproducţia de acid p-aminobenzoic.

Alţi agenţi chimioterapeutici de sinteză

Familia derivaţilor *diaminopirimidinici* cuprinde *trimetoprimul* şi *tetroxoprimul*. Trimetoprimul blochează metabolismul dependent de acidul folic, dar la alt nivel decât sulfonamidele, a căror eficienţă o ridică foarte mult. Agentul inhibă dihidrofolat-reductaza, enzima care converteşte dihidrofolatul la cofactorul activ – *acidul tetrahidrofolic*. Trimetoprimul blochează regenerarea acidului tetrahidrofolic, fiind un inhibitor al creşterii bacteriilor, mai eficient decât sulfonamida.

Trimethoprim



Tetroxoprim

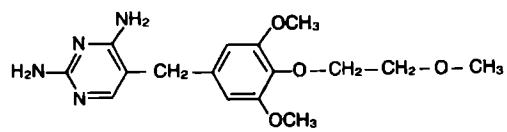
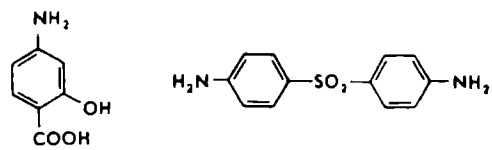


Fig. 86. Structura moleculară a trimetoprim şi tetroxoprim (după Greenwood, 1998).

Rezistenţa la trimetoprim (codificată de Tn7) este consecinţa dobândirii, probabil prin mutaţie, a unei gene a dihidrofolat-reductazei, mult mai puţin sensibilă la trimetoprim.

Ca şi sulfamidele, *acidul paraaminosalicilic* (PASA) şi *dapsone*, obţinuţi prin sinteză chimică sunt inhibitori competitivi ai metabolismului APAB.

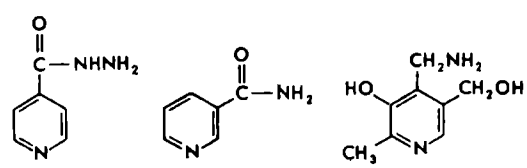


Acid p-amino-salicilic (PAS)

Dapsone (diaminodifenil-sulfone)

Fig. 87. Structura moleculară a altor inhibitori competitivi ai metabolismului APAB: acidul para-amino-salicilic (PASA) şi dapsone (diamino-difenil-sulfonic).

Hidrazida acidului nicotinic (izoniazida) este activă prin competiţie cu piridoxina (vitamina B_6). Toate cele trei (PASA, dapsone şi izoniazida) se folosesc pentru tratamentul infecţiilor cu *Mycobacterium*, deoarece inhibă sinteza acizilor micolici (acizi graşi specifici acestor bacterii).

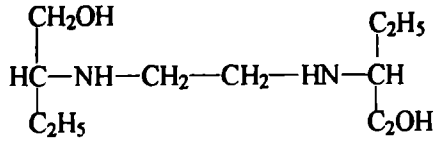


Izonoazid Nicotinamida Piridoxamina

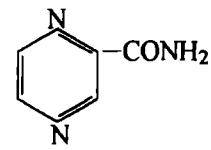
Fig. 88. Structura izoniazidei (hidrazida acidului izonicotinic) şi a metaboliţilor cu care se aseamănă (nicotinamida şi piridoxamina), a căror sinteză o blochează (după Davis, 1990).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

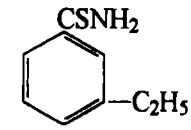
Etambutolul, pirazinamida şi *etionamida* blochează reacţiile enzimatice în celula bacteriană, deoarece sunt similare dar nu identice cu vitaminele bacteriene.



Etambutol



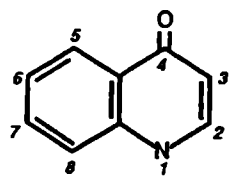
Pirazinamida



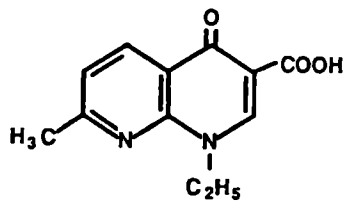
Etionamida

Fig. 89. Structura moleculară a etambutolului, pirazinamidei şi etionamidei.

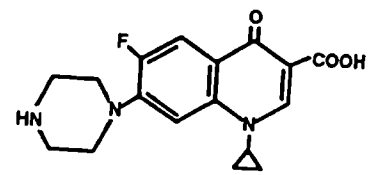
Quinolonele (denumite şi 4-quinolone) sunt primele substanţe antimicrobiene obţinute pe cale sintetică şi formează o familie de compuşi care se aseamănă prin existenţa nucleului quinolinic. Primul compus din acest grup, folosit in terapie este *acidul nalidixic*.



4-Quinolona



Acid nalidixic



Ciprofloxacin

Fig. 90. Quinolona şi doi dintre derivaţii săi (acidul nalidixic şi ciprofloxacina).

Gama derivaţilor quinolonei s-a diversificat prin modificarea nucleului de bază 4-quinolona. La atomul C_6 s-a adăugat unul de *fluor*, ceea ce a crescut semnificativ spectrul şi potenţialul lor antimicrobian.

Mecanismul de acţiune a quinolonelor este foarte complex. Ele blochează acţiunea ADN-girazei bacteriene (dar nu a celulei eucariote). ADN-giraza utilizează energia rezultată prin hidroliza ATP şi catalizează suprarăsucirea negativă a ADN dublu catenar circular închis. ADN-giraza este o enzimă esenţială pentru mai multe procese vitale: iniţierea, alungirea şi terminarea replicării ADN, transcrierea unor operoni, repararea ADN, recombinarea şi transpoziţia. Quinolonele formează un complex cu ADN-giraza şi cu ADN, împiedicând acţiunea catalitică a ADN-polimerazei la nivelul bifurcaţiei de replicare.

ADN-giraza este o topoizomerază, adică modifică configuraţia spaţială a moleculei de ADN, prin introducerea suprarăsucirilor negative, uşurând împachetarea cromosomului bacterian în spaţiul restrâns al celulei.

Ciprofloxacinul are un potenţial antibacterian mult mai ridicat decât acidul nalidixic.

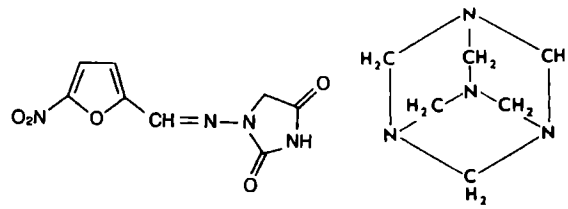
Derivaţii quinolonici se folosesc pentru tratamentul infecţiilor căilor urinare, unde după administrare orală, se acumulează în concentraţii inhibitorii. Cele mai sensibile la acţiunea quinolonelor sunt enterobacteriile, dar compuşii grupului sunt activi faţă de chlamidii şi micobacterii. Efectul bactericid al ciprofloxacinului este rapid, cu o pierdere de 90% a viabilităţii, într-un interval de 19 minute.

Quinolonele au efect antimicrobian prelungit după administrare, ceea ce se reflectă în continuarea supresiei creşterii bacteriene, după eliminarea agentului antimicrobian din organism. Dacă un medicament are un efect persistent după administrare, înseamnă că poate fi eficient chiar în intervalele dintre doze, când nivelul seric şi tisular au scăzut sub nivelul concentraţiei minime inhibitorii.

Variantele rezistente la quinolone se selectează şi se datorează modificării porinelor din membrana externă, asociată cu scăderea permeabilităţii. Rezistenţa la quinolone nu este transferabilă prin intermediul plasmidelor. Nu s-a identificat nici un produs cu efect inactivator faţă de quinolone, aşa cum beta-lactamaza inactivează penicilina sau cefalosporinele.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Methenamina este produsul ciclic de condensare a formaldehidei şi amoniului. Este excretată în urina acidă, unde este hidrolizată şi formaldehida este bactericidă. Se asociază cu acidul mandelic pentru acidifierea urinii. Tulpinile de *Proteus*, care produc frecvente infecţii urinare sunt rezistente, deoarece ureaza lor clivează ureea la CO_2 şi NH_3 şi alcalinizează urina.



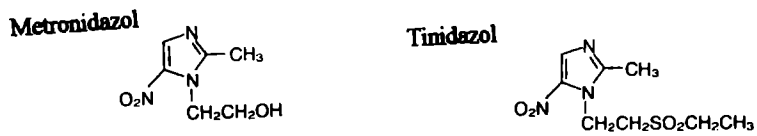
Nitrofurantoina Methenamina

Fig. 91. Compuşi sintetici utilizaţi pentru tratamentul infecţiilor tractului urinar.

Derivaţii *nitrofuranului* (furazolidon, nitrofurantoina, nitrofuratel, nitrofurazon) au efect bacteriostatic faţă de bacteriile Gram pozitive şi Gram negative. Cel mai utilizat este nitrofurantoina.

Derivaţii nitrofuranului se folosesc pentru terapia infecţiilor tractului urinar, deoarece realizează concentraţii suficient de mari în urină. Nu au acţiune sistemică. Un intermediar redus al nitrofuranilor produce ruperea catenei de ADN, ceea ce explică efectele mutagene ale acestor compuşi *in vitro*. Metaboliţii reactivi ai nitrofurantoinei interferă nu numai cu ADN, ci şi cu sinteza proteinelor.

Nitroimidazolii au spectru larg de acţiune (bacterii, fungi, protozoare, helminţi). Cei cu activitate antibacteriană sunt 5-nitroimidazolii: 2-metronidazolul şi tinidazolul.



Metronidazol Tinidazol

Fig. 92. Structura moleculară a nitroimidazolilor.

Efectul lor antibacterian este dependent de reducerea grupării *nitro* în condiţii anaerobe. Compuşii captează electronii din feredoxina redusă, generată în reacţia de decarboxilare a piruvatului. Produsul reducerii are efect letal, probabil prin ruperea catenei de ADN. Unele bacterii microaerofile sunt deosebit de sensibile, dar mecanismul morţii lor nu se cunoaşte.

Un parametru esenţial al unui agent chimioterapeutic este *indexul terapeutic*, adică raportul dintre doza toxică minimă şi doza cu eficienţă maximă. Valoarea mare a acestui raport este caracteristică agenţilor chimioterapeutici foarte eficienţi.

Antibioticele

Antibioticele sunt un grup heterogen de substanţe chimice, produse de microorganisme prin procese de biosinteză, care omoară sau inhibă creşterea altor specii de microorganisme.

Definiţia iniţială s-a completat ulterior, deoarece antibioticele sunt substanţe chimice obţinute prin biosinteză sau semisinteză, ce distrug unele microorganisme sau le inhibă multiplicarea.

Fenomenul de antibioză a fost descris de Pasteur (1889). Primul antibiotic (penicilina) a fost descoperit de Fleming (1929). Calităţile sale de medicament miraculos au fost evidenţiate de către Florey H. şi Chain E., iar producţia industrială a început în 1943.

Antibioticele sunt produse de trei grupe de microorganisme: actinomicete, bacili Gram pozitivi şi mucegaiuri.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Din cele peste 500 antibiotice identificate, pentru terapia infecţiilor umane şi animale se foloseşte un număr restrâns (circa 100), produse de membrii a 5 genuri de microorganisme: *Bacillus, Streptomyces, Micromonospora, Penicillium, Cephalosporium*. Celelalte sunt toxice ori au efecte defavorabile asupra organismului sau sunt lipsite de selectivitate.

Izolarea microorganismelor producătoare de antibiotice este foarte laborioasă. Din 134 700 tulpini bacteriene izolate din circa 5000 de probe diferite de sol, o singură tulpină a prezentat interes practic.

Cephalosporium a fost izolat din apa mării, lângă un canal de deversare a apelor menajere. *Streptomyces* s-a izolat din tubul digestiv al unui pui de gaină, iar *Bacillus*, dintr-o rană tegumentară a unei fetiţe (Tracy) şi de aici s-a dat denumirea antibioticului *bacitracina*.

Marea majoritate a antibioticelor se obţine în procese industriale, pe cale microbiologică.

In prezent, numai porţiunea majoră a moleculei de antibiotic este sintetizată de microorganisme, iar restul moleculei este sintetizată pe cale chimică. Se obţin astfel, antibiotice de *semisinteză* sau prin metode *bioconversie*. In unele cazuri (de exemplu, cloramfenicolul), întreaga moleculă se sintetizează pe cale chimică, datorită structurii sale moleculare simple.

Convenţional, în categoria antibioticelor sunt incluse şi substanţele de *semisinteză* sau cele sintetizate *artificial*, dar pe care microorganismele le pot sintetiza total sau parţial. Această menţiune (că microorganismele le pot sintetiza total sau parţial) este necesară, pentru ca din categoria antibioticelor să se excludă compuşii cu efect antibacterian sintetizaţi numai pe cale chimică (sulfamidele) sau cei produşi în organismele superioare (lizozimul).

Structurile moleculare complexe ale antibioticelor combină derivaţi a două sau mai multe grupe de metaboliţi: aminoacizi, glucide, bazele acizilor nucleici, intermediari ai sintezei lipidelor. Acetil-CoA şi propionil-CoA formează catene lungi (ca în sinteza acizilor graşi) şi rezultă poli-beta cetone ($RCO - CH_2 - CO - CH_2$ -), care se condensează pentru a forma inelele macrolidelor, polienelor, tetraciclinelor sau porţiuni ale moleculei altor antibiotice.

Clasificarea antibioticelor în funcţie de structura chimică

Din punct de vedere chimic, antibioticele sunt un grup de substanţe foarte heterogene. Se disting următoarele categorii:

1. *Antibioticele beta-lactamice* cuprind în structura lor inelul beta-lactamic şi la rândul lor sunt foarte diverse.

Penicilina nativă (benzil-peniclina sau peniclina G) este alcătuită din inelul beta-lactamic şi inelul tiazolidinic. La C_6 este ataşat grupul fenil-acetamido.

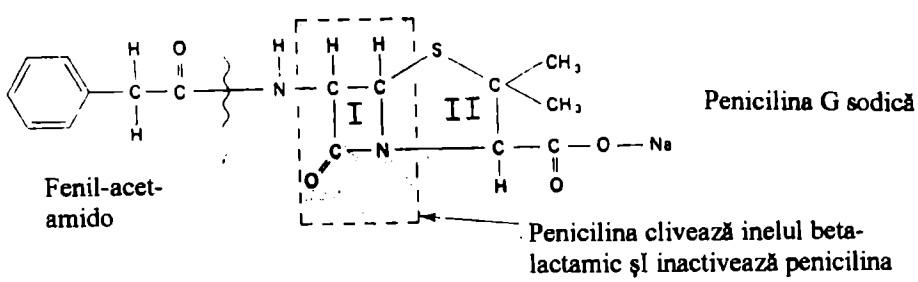


Fig. 93. Structura moleculară a penicilinei G. I = inelul beta-lactamic. II = inelul tiazolidinic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

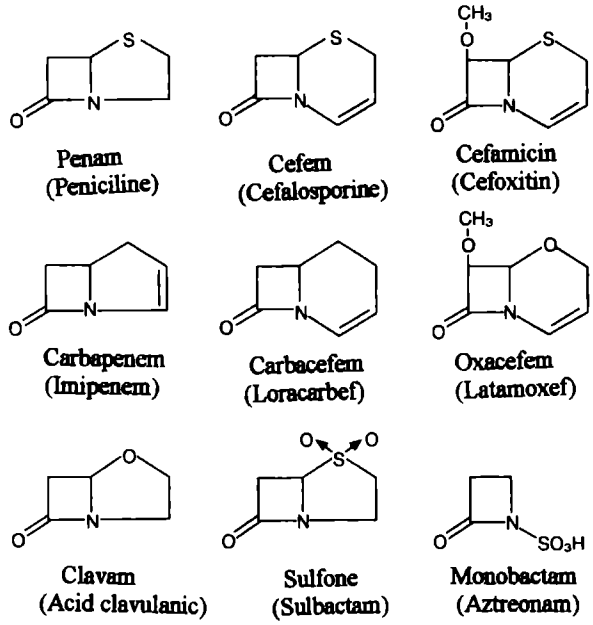


Fig. 94. Structura moleculară a diferitelor tipuri de antibiotice beta-lactamice (după Greenwood, 1998).

La *cefalosporine*, inelul tiazolidinic are un atom de C suplimentar, cu o legătură nesaturată între C_3 şi C_4 şi rezultă o structură denumită *cefem*.

Cefamicinele sunt similare ca structură chimică, dar inelul beta-lactamic conţine un grup metoxi, care-i conferă stabilitate la multe enzime beta-lactamazice.

Alte variante structurale ale compuşilor beta-lactamici utilizaţi în clinică sunt: carbapenem, carbacefem, oxacefem, clavam (acid clavulanic), sulfone, monobactam.

Penicilinele semisintetice se obţin din acidul 6-aminopenicilanic, care se condensează cu orice acid carboxilic. Rezultă astfel un număr mare de peniciline: oxacilina şi derivaţii săi, meticilina, ampicilina, amoxicilina, azlocilina, mezlocilina, piperacilina, ticarcilina.

Acidul 6-aminopenicilanic, pentru penicilinele semisintetice se obţine prin tratamentul penicilinei cu o amidază sau prin cultivarea mucegaiului, într-un mediu fără donorul grupării acil.

Acidul 6-aminopenicilanic este un dipeptid ciclic, format prin condensarea L-cisteinei şi D-valinei şi de aceea penicilinele, cefalosporina şi cloramfenicolul aparţin grupului antibioticelor oligopeptidice.

Cloramfenicolul este un antibiotic simplu, care în cea mai mare parte se obţine prin sinteză chimică. Are un spectru larg de acţiune, care include şi bacteriile parazite obligat intracelulare: chlamidii, rickettsii, dar şi bacteriile Gram pozitive şi Gram negative.

Cloramfenicol

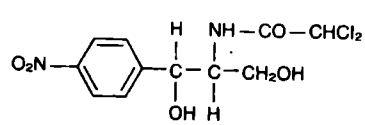


Fig. 95. Structura moleculară a cloramfenicolului.

Cloramfenicolul conţine o grupare *nitro* şi un grup *diclor-acetil*. El se leagă de subunitatea ribosomală mare şi blochează transferul peptidil, la ribosomii care alungesc catena. Este sintetizat de *Streptomyces*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. *Antibiotice polipeptidice*: bacitracina (produsă de *B. subtilis*), gramicidina (sintetizată de *B. brevis*), cicloserina (produsă de *Streptomyces*), actinomicina, polimixina (sintetizată de *B. polymyxa*).

Bacitracina este un peptid ciclic ce împiedică defosforilarea purtătorului lipidic ce transferă noul peptidoglican, prin membrana celulei, în timpul sintezei peretelui celular. Bacitracina derivă dintr-o proteină a celulei vegetative, care este degradată parţial în timpul sporulării. Este toxică pentru a fi aplicată sistemic, dar se găseşte în formulări pentru aplicaţii locale.

Polimixinele sunt o familie de antibiotice produse de specii de *Bacillus*. O parte a polipeptidului are o configuraţie ciclică, cu o "coadă" hidrofobă de acid octanoic. In clinică se folosesc *polimixina B* şi *polimixina E* (colistina), precum şi derivaţii lor sulfometilaţi. Polimixinele sulfometilate au activitate antibacteriană redusă, dar se clivează spontan şi rezultă compuşi mai activi.

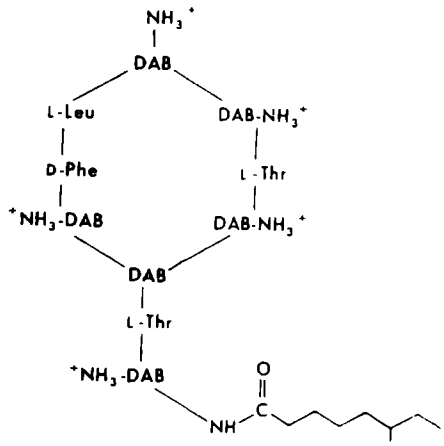
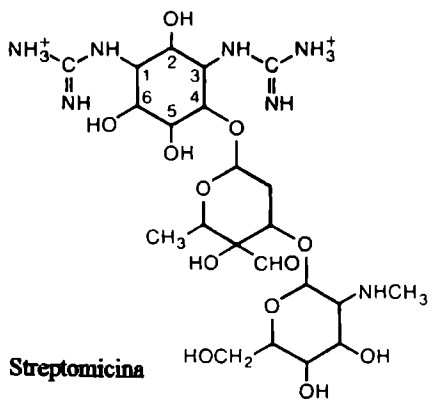


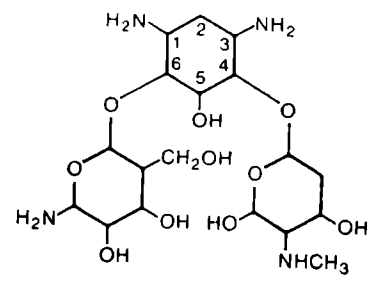
Fig. 96. Polimixina B. DAB = acidul alfa, gama-diaminobutiric ($NH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$). Restul alifatic este acidul 6-metiloctanic (după Greenwood, 1998).

Tyrocidina şi *gramicidina* S sunt polipeptide ciclice. Ele produc dezorganizarea membranei, rezultatul fiind pierderea moleculelor mici şi liza protoplaştilor. Nu se folosesc pentru administrare sistemică, deoarece sunt toxice.

3. *Antibioticele aminoglicozidice* sunt sintetizate de actinomicete din g. *Streptomyces*. Molecula lor polară, policationică, conţine un *aminociclitol*, de care se leagă două sau mai multe glucide, dintre care cel puţin unul este aminat. La streptomicină, aminociclitolul este diguanidin-inozitolul (streptidina).



Streptomicina



Gentamicina A

Fig. 97. Antibiotice aminoglicozidice. Toate conţin un inel aminociclitol şi unul sau mai multe zaharuri aminate. La streptomicină, inelul este streptidina (1,3 - diguanidino-inozitol). La gentamicină şi la multe alte aminoglicozide, inelul este deoxistreptamina, cu două grupări amino în locul grupelor guanidino (după Greenwood, 1998).

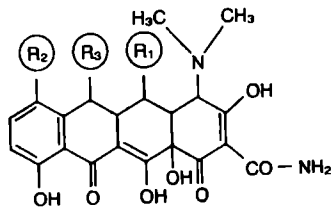
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Majoritatea aminoglicozidelor au grupul aminociclitol reprezentat de deoxistreptamină. Ele se împart în derivaţi ai neomicinei, kanamicinei, gentamicinei.

Aminoglicozidele sunt active faţă de numeroase bacterii infecţioase Gram pozitive şi Gram negative, dar şi faţă de *M. tuberculosis*. Legarea unei singure molecule este suficientă pentru inactivarea ribosomului bacterian. Aceste antibiotice nu traversează uşor membranele celulare. Se absorb cu dificultate din intestin, dar pentru modificarea microbiotei intestinale, administrarea orală este calea optimă. Sunt ineficiente faţă de bacteriile cu localizare intracelulară. Anaerobia şi prezenţa cationilor bivalenţi diminuă eficienţa aminoglicozidelor. Se administrează numai în cazul infecţiilor severe (tuberculoză, bruceloză, tularemie, plaga bubonică). Sunt sinergice cu antibioticele beta-lactamice şi se folosesc în septicemiile cu bacterii Gram negative. Pentru a-şi exercita efectul bactericid, aminoglicozidele necesită sinteza proteică.

4. *Antibioticele poliketide* (acetogenine) sunt substanţe naturale derivate din acizi poli-beta-cetonici, care la rândul lor se formează din acetil-CoA şi mai multe molecule de malonil-CoA, după decarboxilare: griseofulvina (produsă de *Penicillium patulum*), tetraciclina (sintetizată de *Streptomyces*).

Tetraciclinele sunt un grup de substanţe naturale sau de semisinteză, care diferă prin natura radicalilor ataşati de structura de bază – *inelul naftacenic*: clor-tetraciclina, oxitetraciclina. Tetraciclinele sunt cel mai important grup de antibiotice, datorită spectrului antibacterian foarte larg. Sunt active faţă de bacteriile Gram pozitive şi Gram negative, faţă de protozoarul *Entamoeba* etc. Acţionează prin inhibiţia sintezei proteinelor la nivelul ribosomilor.



	R1	R2	R3
Tetraciclina	–H	– H	CH3, OH
Oxitetraciclina	–OH	– H	CH3, OH
Clortetraciclina	–H	– Cl	CH3, OH
Minociclina	–H	– N(CH3)(CH3)	H, H
Doxiciclina	–OH	– H	CH3, H

Fig. 98. Structura moleculară a celor mai importante tetracicline (după Greenwood, 1998).

5. *Antibioticele macrolide*. Denumirea de "macrolid" desemnează o structură chimică caracterizată prin prezenţa unui ciclu lactonic cu complexitate variabilă, la care se ataşează componenta glucidică. Ciclul lactonic rezultă prin închiderea unui lanţ lung de acizi graşi hidroxilaţi. Antibioticele macrolide sunt foarte diverse, datorită atât variaţiei inelului macrolidic, cât şi complexului glucidic. Cele mai cunoscute sunt *eritromicina* şi *oleandomicina*.

Eritromicina şi alte macrolide penetrează greu peretele bacteriilor Gram negative. Sunt active faţă de *H. influenzae, Legionella pneumophila, Campilobacter jejuni, Mycoplasma pneumoniae*.

Eritromicina se leagă de subunitatea ribosomală 50S şi interferă cu procesul de translocaţie a polipeptidului nascent.

Antibioticele macrolide sunt sintetizate de membrii g. *Streptomyces*. Eritromicina este un înlocuitor al penicilinei, la persoanele alergice pentru ciclul beta-lactamic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

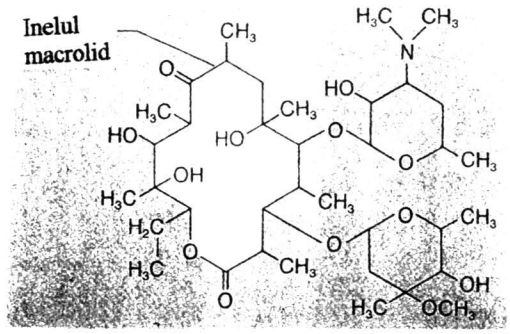


Fig. 99. Structura eritromicinei, din grupul antibioticelor macrolide (după Brock, 1988).

6. *Antibioticele steroidice* au o structură chimică asemănătoare *colesterolului*. *Acidul fusidic* (fusidina) este produs de mucegaiul *Fusarium*. Este activ prin legarea de *factorul de elongaţie G* (EFG).

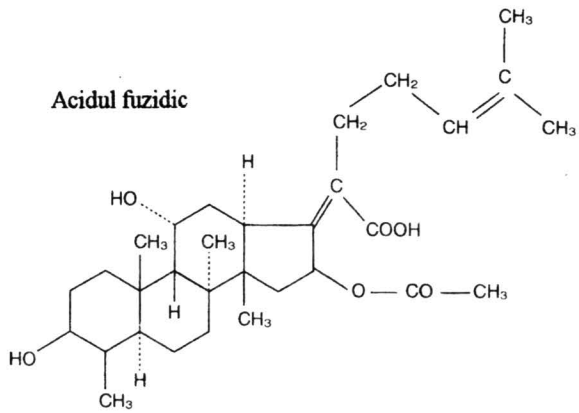


Fig. 100. Structura moleculară a acidului fusidic (după Greenwood, 1998).

7. *Antibioticele polienice* se caracterizează prin prezenţa, în molecula lor, a unui anumit număr de legături duble: nistatina, amfotericina B, candicidina (produse de membri ai g. *Streptomyces*), iar funigalina este sintetizată de *Aspergillus fumigatus*.

8. *Antibiotice glicopeptidice*. In clinică se folosesc două glicopeptide: *vancomicina* şi *teicoplanina*. Vancomicina este produsă de *Nocardia*. Este un heptapeptid rezultat din aminoacizi aromatici modificaţi şi condensaţi într-o structură triciclică, de care se ataşează un dizaharid. Mecanismul acţiunii sale constă în blocarea creşterii celulei, deoarece formează un complex cu D-ala-D-ala din peptidul mureinic. Este activă faţă de multe bacterii Gram pozitive şi nu selecţionează mutante rezistente.

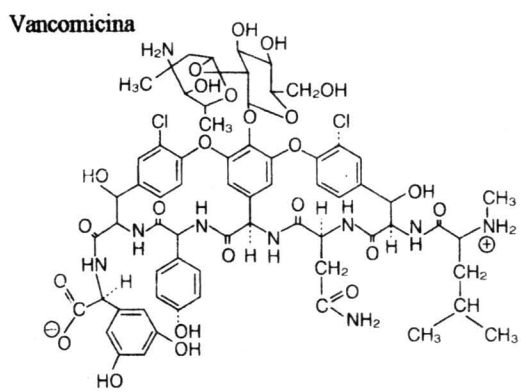


Fig. 101. Structura moleculară a vancomicinei (după Greenwood, 1998).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mecanismele de acţiune a antibioticelor

Antibioticele îşi datorează acţiunea selectivă faţă de celulele microorgnismelor, reactivităţii lor chimice mai înalte sau exclusive faţă de unele componente ale celulei bacteriene sau fungice, în raport cu celulele umane şi animale.

In unele cazuri, antibioticele interacţionează cu molecule caracteristice microorganismelor şi de aceea indexul lor terapeutic este foate înalt. De exemplu, penicilina este activă faţă de sinteza mureinei, componenta specifică a peretelui bacterian. Penicilina reacţionează şi cu moleculele proprii organismului uman şi animal, la concentraţii de câteva mii de ori mai mari decât cele necesare pentru a omorî bacteriile.

Majoriatea antibioticelor sunt *bacteriostatice* sau *bactericide*. Efectul bacteriostatic semnifică inhibiţia reversibilă a creşterii, iar cel bactericid are semnificaţia unei acţiuni letale ireversibile. Excepţie fac griseofulvina şi antibioticele polienice, care sunt antifungice.

Mecanismele de acţiune a antibioticelor sunt diferite, consecinţă a diversităţii structurii lor moleculare. Cele mai multe sunt molecule complexe, cu regiuni hidrofobe, ce uşurează difuzia in celule. Cea mai simplă modalitate de a le clasifica, este în funcţie de situsul de acţiune în celula bacteriană:

- antibiotice ce acţionează asupra sintezei componentelor chimice ale *peretelui celular* (penicilina, cefalosporina, bactracina, cicloserina, fosfomicina);
- antibiotice active asupra sintezei *proteinelor bacteriene* (aminoglicozide, cloramfenicol, tetraciclina, macrolide, streptogramina);
- antibiotice active la nivelul *acizilor nucleici* (rifamicina, novobiocina);
- antibiotice active asupra *membranei celulare* (polimixina, gramicidina, tirocidina, valinomicina, monensina – ultimele două nefolosite în clinica umană).

Antibiotice care inhibă sinteza peretelui celular

Peretele celular este una din ţintele primare pentru antibiotice. Efectul lor se realizează prin inhibiţia sintezei unui component parietal sau prin inhibiţia polimerizării componentelor chimice ale mureinei.

Antibioticele beta-lactamice interferă cu reacţia finală de transpeptidare, ce formează legăturile tranversale între catenele adiacente de peptidoglican, cele care conferă rigiditatea structurii parietale.

Antibioticele beta-lactamice sunt bactericide, dar mecanismul acţiunii lor este diferit, asupra bacteriilor Gram pozitive şi Gram negative. La bacteriile Gram negative se produce fenomenul lizei osmotice a celor lipsite de perete celular. La cocii Gram pozitivi, antibioticele beta-lactamice determină pierderea acizilor lipoteichoici parietali. Absenţa lor elimină controlul procesului autocatalitic, care în mod normal este limitat şi dezagregă peptidoglicanul la situsuri strict localizate.

Antibioticele beta-lactamice sunt active numai asupra celulelor bacteriene tinere, aflate în faza de creştere. Penicilina poate fi administrată în doze mari faţă de cele terapeutice, singurul risc fiind manifestările alergice.

Penicilina administrată oral este degradată în cea mai mare parte, de HCl din stomac. De aceea se injectează intramuscular sau intravenos. Se absoarbe rapid în sânge şi este excretată rapid. Din acest motiv se asociază cu procaina, care diminuă excreţia şi îi prelungeşte acţiunea.

Penicilina G se foloseşte pentru tratamentul infecţiilor cu streptococi, meningococi, pneumococi, spirochete, bacili aerobi Gram pozitivi, *Clostridium*. Işi păstrează activitatea în urină şi se foloseşte pentru tratamentul infecţiilor tractului urinar.

Carbapenemii reprezintă un grup de antibiotice cu efect bactericid, ce conţin un antibiotic beta-lactamic şi un compus ce împiedică degradarea medicamentului în rinichi.

Bacitracina (un peptid ciclic) împiedică defosforilarea moleculei lipidice purtătoare, ce transferă molecula de peptidoglican nou sintetizată, prin membrana celulei, în timpul sintezei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

peretelui celular. Este toxică pentru rinichi şi de aceea nu se administrează sistemic, dar se aplică local pentru tratamentul leziunilor tegumentare şi ale membranelor mucoase.

Vancomicina este o moleculă mare, complexă, produsă de *Streptomyces orientalis*. Utilizarea ei este limitată, datorită toxicităţii la nivelul rinichiului.

Cicloserina inhibă competitiv formarea D-ala din L-ala şi astfel stopează sinteza dipeptidului D-ala-D-ala. Este relativ toxică şi se foloseşte pentru tratamentul infecţiilor cu *M. tuberculosis*, rezistent la alte medicamente.

Fosfomicina este un inhibitor al piruvil-transferazei şi astfel blochează sinteza acidului N-acetil-muramic.

Cicloserina şi fosfomicina se comportă ca analogi ai precursorilor peptidoglicanului. Sunt molecule foarte hidrofile şi pătrund în citoplasmă pe calea sistemelor de transport pentru metaboliţii înrudiţi: fosfomicina este anologă cu fosfoenol-piruvatul, iar cicloserina este analogă D-alaninei:

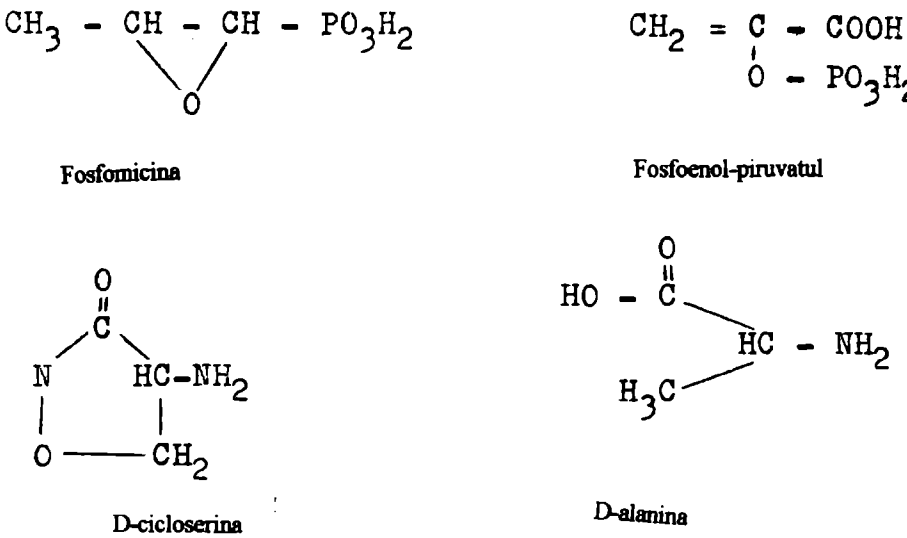


Fig. 102. Fosfomicina, cicloserina şi analogii lor structurali (fosfoenol-piruvatul şi respectiv D-alanina).

Cicloserina şi fosfomicina inhibă sinteza peptidoglicanului.

Antibiotice antiribosomale (inhibitoare ale sintezei proteinelor)

Unele antibiotice acţionează selectiv asupra ribosomilor celulei procariote. Altele (de exemplu, cicloheximida) sunt active faţă de ribosomii celulelor eucariote, iar o altă categorie sunt active faţă de ambele tipuri de ribosomi. Unele sunt active asupra ribosomilor *polisomali* (puromicina, cloramfenicolul), iar altele blochează numai ribosomii *liberi*, de iniţiere a catenei polipeptidice, pentru că situsurile lor de legare sunt restrictive şi nu se pot asocia cu ribosomii polisomali (de exemplu, eritromicina). Unele antibiotice se leagă de subunitatea ribosomală mică, iar altele se asociază cu subunitatea ribosomală mare.

Antibioticele cu acţiune asupra ribosomilor sunt molecule complexe, adeseori având cicluri şi grupări cationice, care favorizează interacţiunile ionice cu ARNr. Spre deosebire de antibioticele care blochează sinteza mureinei la nivelul suprafeţei externe a membranei citoplasmatice, cele care acţionează la nivelul ribosomilor trebuie să pătrundă în citoplasmă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Din punct de vedere chimic, majoritatea sunt *aminoglicozide* policationice, cu molecule polare. Ele au o regiune hidrofobă mare, care uşurează difuzia prin stratul lipidic al membranei.

Aminoglicozidele (streptomicina şi dihidrostreptomicina) modifică conformaţia ribosomului polisomal, astfel încât creşte rata erorilor de împerechere a codonilor cu anticodonii. Mesajul este tradus greşit şi se sintetizează proteine nefuncţionale. Aminoglicozidele sunt active şi faţă de ribosomii liberi: asocierea antibioticului cu ribosomul liber blochează interacţiunea acestuia cu ARNm (se blochează astfel formarea complexului de iniţiere).

Schimbarea mutaţională a unui singur aminoacid într-o proteină a subunităţii ribosomale 30 S, determină rezistenţa celului la streptomicină, dar nu şi la antibioticele care conţin deoxistreptamina ca grup lateral ataşat heterociclului complex, deoarece ele se asociază cu ambele subunităţi ribosomale.

Eritromicina şi alte macrolide (lincomicina şi clindamicina) penetrează greu în celula Gram negativă. Se asociază cu ribosomii liberi, dar nu cu ribosomii polisomali. Se leagă cu subunitatea 50 S şi interferă cu procesul de translocaţie a polipeptidului nascent, producând disocierea peptidil-ARNt de ribosom. Deşi unele antibiotice care interacţionează cu ribosomii liberi blochează complexul de iniţiere, eritromicina stopează sinteza proteică numai după ce s-a sintetizat un polipeptid scurt.

Unele antibiotice policiclice mari se leagă cu subunitatea mare a ribosomului şi blochează legarea factorilor de elongaţie EFTu (*E*longation *F*actor *T*hermo *u*nstable) şi EFG (*E*longation *F*actor *G*, un factor de elongaţie implicat în translocaţia peptidului nascent).

Acidul fusidic are o structură moleculară de tip steroidic. Spre deosebire de alţi inhibitori ai sintezei proteice, nu se leagă direct de ribosomi, ci formează un complex stabil cu guanozin-trifosfatul şi cu factorul de elongaţie G.

Puromicina nu se foloseşte in terapia antiinfecţioasă, dar este utilă în studiul experimental al mecanismului sintezei proteinelor. Ea interferă cu sinteza proteică, producând eliberarea prematură a polipeptidului nascent din asociaţia sa cu ribosomul.

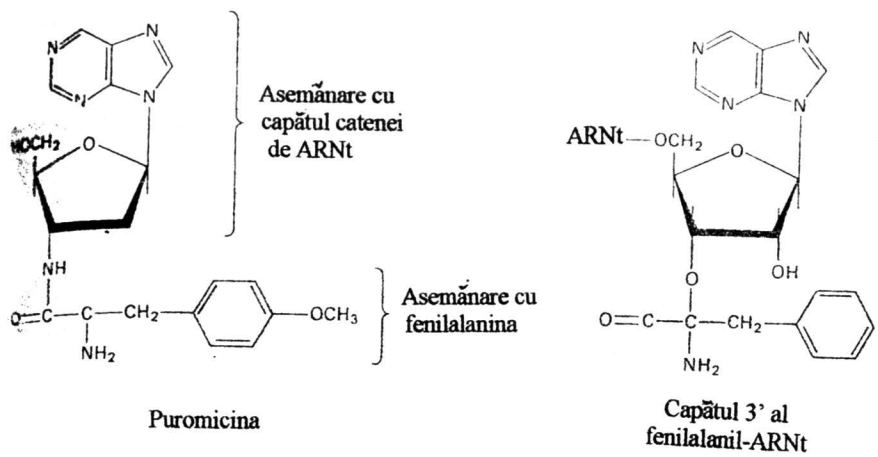


Fig. 103. Asemănarea structurală dintre puromicină şi capătul 3' al fenilalanil-ARNt (după Davis, 1990).

Cloramfenicolul se leagă cu subunitatea ribosomală mare şi blochează alungirea peptidului nascent pe ribosom.

Tetraciclinele sunt preluate de celulele bacteriene prin transport activ. Molecula lor se asociază cu subunitatea ribosomală 30S şi blochează accesul aminoacil-ARNt la situsul acceptor, printr-un mecanism necunoscut. Celulele mamiferelor nu concentrează tetraciclina (aşa cum fac bacteriile) şi de aceea ribosomii lor sunt rezistenţi, cu posibila excepţie a ribosomilor mitocondriali. Rezistenţa la tetracicline este mediată de gene plasmidiale. Se administrează oral, dar formează complexe neabsorbabile cu ionii bivalenţi.

In mod obişnuit, se utilizează tetraciclina, clor-tetraciclina, oxitetraciclina, iar cele noi, de semisinteză, sunt minociclina si doxiciclina. Toate sunt bacteriostatice, se absorb uşor din tubul digestiv şi se distribuie larg în ţesuturi şi fluide, cu excepţia lichidului cefalorahidian.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tetraciclinele au un spectru foarte larg de acţiune: sunt active faţă de multe bacterii Gram pozitive şi Gram negative, faţă de rickettsii, chlamidii, micoplasme şi faţă de unii fungi, dar distrug şi microbiota normală a intestinului şi produc tulburări gastro-intestinale. Tetraciclinele pot produce efecte toxice asupra ficatului şi rinichiului.

Administrarea tetraciclinei în timpul sarcinii sau în primii 5 ani de viaţă are ca rezultat colorarea dinţilor, atât deciduali cât şi permanenţi, doarece mugurii ambelor dentiţii se formează înainte de naştere. Tetraciclina administrată în timpul sarcinii poate duce la deformarea oaselor cutiei craniene a fătului.

Efectele tetraciclinelor asupra dinţilor şi oaselor se datorează capacităţii lor de a lega ioni de Ca^{2+}.

Antibiotice care modifică permeabilitatea membranei plasmatice

Interacţiunea unor antibiotice (gramicidina, polimixina, nistatina, amfotericina B) cu membrana plasmatică a celulei bacteriene produce creşterea permeabilităţii şi pierderea proprietăţilor de membrană selectivă. Rezultatul este moartea celulei prin liză osmotică.

Polimixina acţionează asupra membranei citoplasmatice ca un detergent cationic, având afinitate pentru grupările sale cationice. Este singurul antibiotic cu acţiune bactericidă asupra celulelor aflate în faza staţionară, după ce au depăşit faza de creştere. Acţionează asupra membranei externe, pe care o fragmentează, ceea ce explică acţiunea sa bactericidă şi selectivitatea faţă de bacteriile Gram negative.

Tyrocidina si *gramicidina S* sunt polipeptide ciclice care dezorganizează membrana, producând pierderea moleculelor mici şi liza protoplaştilor. Gramicidina se sintetizează din aminoacizi, printr-un mecanism neribosomal.

Antibioticele polienice (nistatina, amfotericina B) formează complexe cu sterolii din structura membranei plasmatice. Nu sunt active faţă de bacterii, deoarece membrana lor nu conţine steroli, dar inhibă creşterea micoplasmelor, deoarece conţin steroli. Rezultatul interacţiunii cu membranele celulelor sensibile este pierderea permeabilităţii selective, pierderea ionilor de K şi Mg şi diminuarea ratei sintezei proteinelor şi a ARN.

Toate tipurile de celule sensibile la acţiunea antibioticelor polienice conţin steroli. Sterolii sunt componente comune multor grupe de organisme: alge, protozoare, levuri, viermi, mamifere etc. Datorită efectului lor asupra permeabilităţii membranei, antibioticele polienice măresc eficienţa altor antibiotice.

Antibioticele polienice se utilizează în tratamentul *micozelor*. Infecţiile produse de fungi sunt mai rare decât cele bacteriene, rareori pun în pericol viaţa şi adeseori sunt lipsite de impotanţă clinică. Tratamentul micozelor cu agenţi chimici este limitat, datorită absenţei specificităţii acţiunii lor. Cei mai importanţi agenţi antifungici sunt cei ce acţionează asupra membranelor celulare, iar dintre aceştia, nistatina şi amfotericina B.

Amfotericina B este produsă de *Streptomyces nodosus*. Mecanismul acţiunii sale constă în legarea de ergosterolul din membrana plasmatică a celulei fungice, a unor alge şi a unor protozoare, dar şi de celulele umane. Efectul este creşterea permeabilităţii membranei, astfel încât glucoza, K^+ şi alte molecule esenţiale ies din celulă. Amfotericina B se absoarbe puţin din tubul digestiv şi de aceea se administrează prin injectare intravenoasă. Rezistenţa fungică la acest antibiotic nu este cunoscută, dar efectele secundare sunt foarte frecvente şi uneori severe.

Nistatinul (Micostatin) este produs de *Streptomyces noursei*. Mecanismul de acţiune este acelaşi ca şi al amfotericinei B. Se administrează local pentru tratamentul infecţiilor cu *Candida*. Nu se absoarbe din intestin şi se administrează oral, numai pentru tratamentul suprainfecţiilor intestinale, care adeseori sunt consecutive tratamentului cu antibiotice.

Antibiotice care interferă cu funcţiile acizilor nucleici

Rifamicin B este sintetizată natural, iar *rifampicina* este derivatul semisintetic cu cea mai largă utilizare clinică. Rifampicina este alcătuită dintr-o grupare cromoforă aromatică, inclusă într-o catenă alifatică. Ea se asociază cu subunitatea B a ARN-polimerazei şi probabil chiar cu ADN în complexul de iniţiere, blocând astfel iniţierea transcrierii şi sinteza ARN.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Antibioticul se foloseşte în terapia combinată a tuberculozei. Mutantele rezistente, cu subunitatea B a ARN-polimerazei modificată, se selecţionează repede.

Actinomicina D (Dactinomicina) este formată dintr-o grupare cromoforă aromatică şi un ciclu peptidic. Ea interacţionează cu ADN şi inhibă replicarea şi transcrierea. Gruparea aromatică se intercalează în dublul helix al ADN, la perechile GC, iar peptidul ciclic rămâne la suprafaţă.

Novobiocina interferă cu sinteza ARN, deoarece inhibă ARN-polimeraza dependentă de ADN, iar griseofulvina (sintetizată de *Penicillium griseofulvum*) inhibă replicarea ADN, consecutiv interferenţei cu polimerizarea nucleotidelor purinice. Cercetări recente sugerează că novobiocina acţionează asupra subunităţii B a ADN-girazei (topoizomeraza II) care produce şi menţine starea supraspiralizată a ADN. Griseofulvina se foloseşte pentru tratamentul infecţiilor fungice superficiale. Antibioticul interferă cu creşterea fungică, probabil împiedicând formarea aparatului mitotic de diviziune.

Antibioticele care interacţionează cu ADN produc efecte nediscriminatorii asupra ADN bacterian, viral sau al celulei eucariote.

Cunoaşterea mecanismelor de acţiune a antibioticelor este foarte importantă din punct de vedere practic, deoarece asocierea lor adecvată produce un *efect sinergic,* în timp ce asocierea lor întâmplătoare poate avea un efect negativ, prin fenomenul de neutralizare reciprocă. De exemplu, penicilina şi cloramfenicolul sunt antagoniste, deoarece blocând sinteza proteică, cloramfenicolul protejează celula de liza prin şoc osmotic.

In unele cazuri, antibioticele interacţionează cu molecule specifice microorganismelor (dc cxemplu, inhibiţia sintezei mureinei), care nu au corespondent în compoziţia chimică a celulei eucariote, ceea ce condiţionează un *index terapeutic* optim.

Producerea antibioticelor este, aparent, în contradicţie cu păstrarea funcţionalităţii şi chiar a viabilităţii celulei care sintetizează un anumit antibiotic. Totuşi, antibioticul nu este inhibitor al creşterii organismului producător. Fungii nu conţin peptidoglican, astfel că antibioticele beta-lactamice nu găsesc substratul acţiunii lor. La streptomicetele ce produc compuşi beta-lactamici, peptidoglicanul este rezistent, tot aşa cum sunt şi ribosomii streptomicetelor ce produc antibiotice macrolide.

Alteori, efectul antibioticelor asupra componentelor celulare proprii este evitat prin excreţie rapidă, astfel încât antibioticul nu se acumulează în celulă, în forma sa activă.

Aminoglicozidele se sintetizează sub forma compuşilor fosforilaţi inactivi, care se activează prin defosforilare. Alteori, eliberarea antibioticelor este asociată cu sporularea şi astfel viabilitatea organismului producător nu este afectată.

Antibioticele sunt *metaboliţi secundari*, adică se sintetizează după încetarea creşterii. Comparativ cu metaboliţii primari, antibioticele au specifcitate redusă de biosinteză, deoarece acelaşi organism sintetizează un grup de molecule înrudite.

Unele antibiotice au rol în dinamica proceselor dc sporulare. Altele sunt produse secundare, rezultate din degradarea peretelui celular, corelată cu sporularea, deoarece peretele conţine D-aminoacizi şi glucide care se regăsesc în compoziţia chimică a unor antibiotice.

Producerea antibioticelor a evoluat ca un mecanism ecologic de inhibiţie a creşterii altor microorganisme, cu care intră în competiţie pentru resursele energetice. Fenomenul se numeşte antibioză şi are o semnificaţie funcţională opusă simbiozei. Dar microorganismele producătoare de antibiotice reprezintă o proporţie foarte mică din totalul microorganismelor din sol. Faptul că antibioticele se sintetizează la sfârşitul fazei de creştere, pare să nu le confere un avantaj competitiv real.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

VIROLOGIE

Virusurile sunt agenţi infecţioşi de natură nucleoproteică, cu particularităţi unice atât din punct de vedere structural şi biochimic, cât şi sub raportul participării lor în diferite interrelaţii cu sistemele biologice. Unicitatea lor structurală şi funcţională reiese indirect şi din faptul ca virusurile nu sunt incluse în nici unul din sistemele de clasificare a lumii vii.

Etimologic, denumirea de "virus" vine de la cuvântul grecesc "ios", al cărui sens este "otravă de natură biologică". Prin latinizarea acestui cuvânt a derivat noţiunea de "virus'.

Ştiinţa care se ocupă de studiul virusurilor se numeşte *Virologie*.

Primele cunoştiinţe ştiinţifice referitoare la virusuri datează de mai bine de un secol, însă preocupările de ordin practic pentru tratarea sau prevenirea unor maladii virale, datorită caracterului lor evident şi uneori foarte grav sunt cunoscute din cele mai vechi timpuri. Incă din anii 2500 înainte de Christos, în China existau descrieri ale variolei umane, care se refereau atât la simptomatologia cât şi la caracterul transmisibil al acestei maladii. Aristotel (484-322) afirma că rabia (turbarea) este transmisă prin muşcătura de câine.

Preocupările cu caracter strict aplicativ au devansat cu mult timp descoperirea propriu-zisă şi definirea pe plan conceptual a noţiunii de virus. In 1796, Edward Jenner a introdus vaccinarea *variolică*, sesizând că mulgătorii de vaci, care se infectează cu virusul *cowpox* devin rezistenţi la infecţia cu virusul *variolei* (smallpox). L.Pasteur (1822-1895) a fundamentat ştiinţific practica producerii şi utilizării *vaccinului rabic*, fără să evidenţieze agentul infecţios. El presupunea că maladia este rezultatul infecţiei animalelor şi omului sanătos, cu un agent infecţios de dimensiuni foarte mici, cu particularităţi distincte, invizibil cu mijloacele optice ale timpului său şi care nu poate fi izolat prin metodele aplicabile altor agenţi patogeni. In 1892, D. I. Ivanovski a arătat ca boala infecţioasă denumită *mozaicul tutunului* este datorată unui agent transmisibil, invizibil la microscop şi care străbate filtrele ce reţin celulele bacteriene. Leziunile caracteristice sunt transmise în serie de la o plantă bolnavă, la cele sănătoase, prin filtratele de lichid acelular extras din frunzele infectate. In 1897, Beijerinck a confirmat filtrabilitatea acestui agent patogen, intuind natura sa deosebită şi l-a considerat ca fiind un agent "*contagium, vivum, fluidum*"(contagios, viu, fluid, adică trece prin filtrele care reţin bacteriile). A. Lwoff (1957) îl consideră pe Beijerinck ca fiind adevăratul *întemeietor al Virologiei* ca ştiinţă.

Modelul general de structură a virionului

Descoperirile referitoare la anatomia virusurilor se referă totdeauna la *virion* – unitatea integrată de structură şi funcţie a tuturor virusurilor – dotată cu proprietatea de infecţiozitate a celulelor sensibile.

Din punct de vedere morfologic se disting următoarele tipuri de virioni:

- virioni de formă *sferică* (izodiametrică) sau sferoidală (de exemplu, virusurile gripale, adeno- şi herpesvirusurile, picorna şi reovirusurile etc.);
- virioni de formă *cilindrică* alungită, adică de bastonaş rigid sau flexibil (de exemplu, virusul mozaicului tutunului, fagii filamentoşi);
- virioni de formă *paralelipipedică*, caracteristică poxvirusurilor (de exemplu, virusul vaccinal, virusul variolei etc.);
- virioni cu formă de *obuz* sau de cartuş, la rhabdovirusuri;
- virioni în formă de *cireaşă cu coadă* (de exemplu, fagii cu coadă).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dimensiuni. Virusurile au dimensiuni submicroscopice. Cele mai mari sunt orthopoxvirusurile, de 240 – 300 μm, adică apropiate de dimensiunile celor mai mici bacterii, la limita de rezoluție a microscopiei optice. Bacteriofagii cei mai mari ating 200 μm. Cele mai mici sunt enterovirusurile, sub 30 μm diametru, adică de dimensiunile ribosomilor (25–30 μm diametru).

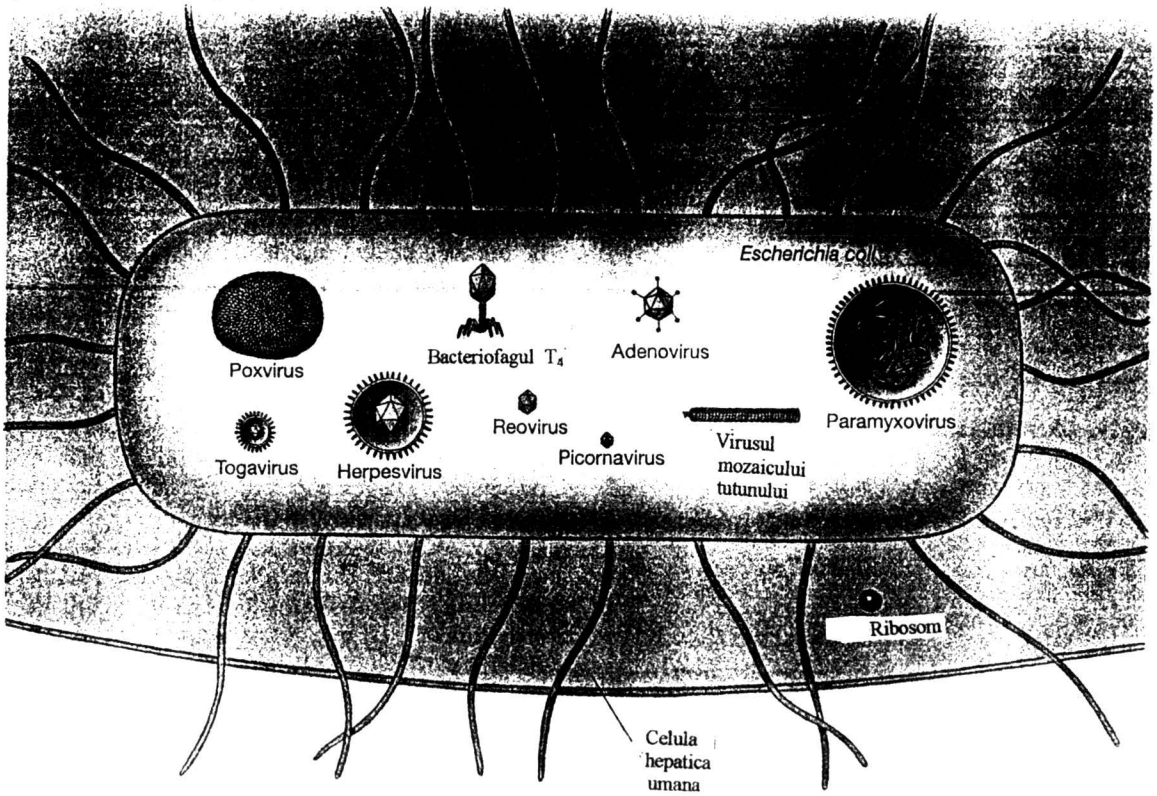


Fig. 104. Variațiile aspectului și dimensiunilor virionilor, în comparație cu celula bacteriană, cu celula animală și cu ribosomul de tip eucariot.

Majoritatea virusurilor au un aspect specific, conferit de modul de așezare a capsomerelor în capsidă. Unele virusuri au o *capsidă helicală*, ce constă dintr-o înlănțuire a moleculelor proteice (capsomere), într-o catenă ce formează o spirală în jurul acidului nucleic. Alte virusuri au o *capsidă poliedrică*. Cel mai comun poliedru este *icozaedrul*.

Virusurile învelite au un aspect sferic, deși capsida lor poate fi icozaedrică.

Tehnicile de centrifugare analitică au făcut posibilă obținerea unor cantități mari de virus purificat. Studiile de difracție cu raze X a preparatelor virale în stare cristalină și paracristalină, au evidențiat organizarea internă a virionului, precum și relațiile spațiale ale diferitelor componente structurale.

Virionii posedă doi constituienți structurali esențiali și definitorii: *genomul* și *capsida*. Virusurile alcătuite numai din genom și capsidă sunt *nude*. La virusurile *învelite*, celor două componente obligatorii se adaugă o structură de suprafață, *denumită peplos sau înveliș extern*. Peplosul poartă pe suprafața sa, niște subunități proeminente (peplomere), denumite *spicule*.

Capsida virală

Capsida este o structură proteică ce acoperă genomul viral (*capsa*, grec = cutie). Cea mai mică unitate structurală a capsidei este *capsomera*. La rândul ei, capsomera este alcătuită dintr-un lanț polipeptidic (fiind și unitate biochimică) sau dintr-un agregat de catene polipeptidice identice sau diferite. Capsomerele sunt cele mai mici unități structurale vizibile la microscopul electronic. In general, la virusurile cu simetrie helicală, capsomerele sunt *unități morfologice* ale capsidei și în același timp sunt *unități de structură biochimică*, fiind formate dintr-un singur polipeptid.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

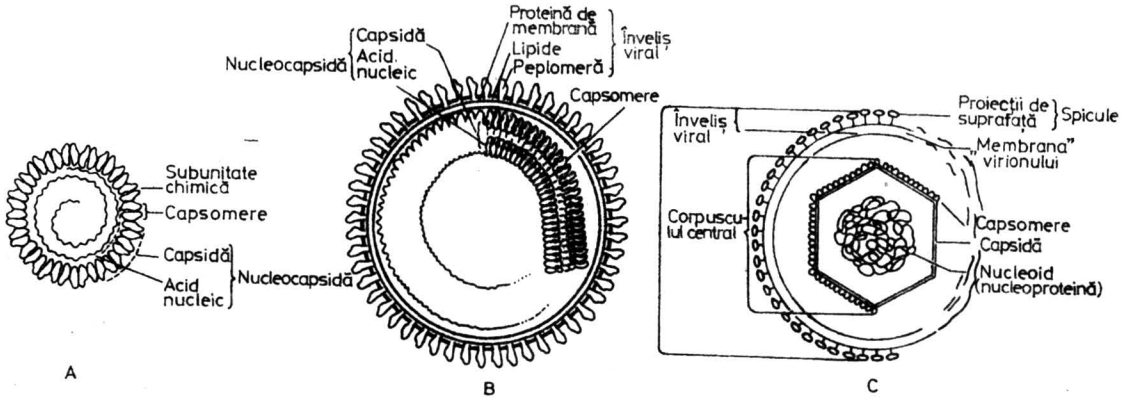


Fig. 105. Reprezentare schematică a structurii virionului. A. Virion nud cu capsidă helicală. B. Virion acoperit de învelișul viral, cu nucleocapsidă tubulară și simetrie helicală. Învelișul este format dintr-un dublu strat fosfolipidic, în care sunt inclavate proteine virale sub formă de spicule (peplomere). Învelișul este tapetat la interior, de o proteină de membrană, codificată de virus. C. Virion icozaedric format dintr-o regiune centrală („core"), în care se găsește genomul acoperit de capsida icozaedrică. Cele două componente formează nucleocapsida. Învelișul viral, prevăzut cu spicule, acoperă nucleocapsida.

La virusurile cu simetrie icozaedrică, capsomerele sunt numai unități morfologice, dar din punct de vedere biochimic sunt *oligomere*. In alcătuirea lor intră mai multe unități biochimice: cele cu structură de penton conțin 5 subunități (sunt pentamere), iar cele cu structură de hexon conțin trei subunitați (sunt trimere). Polipeptidele din structura oligomerului pot fi identice sau diferite.

Învelișul extern

Învelișul extern sau *peplosul* (*peplos*, grec = manta) este o structură accesorie care acoperă capsida unor virusuri. Peplosul este dobândit în timpul maturării virionilor prin procesul de *înmugurire*, care, în general are loc la suprafața celulei (herpesvirusurile se învelesc prin înmugurire la nivelul membranei nucleare).

Peplosul viral întrunește toate criteriile de structură trilaminară ale membranei celulei animale: stratul fosfolipidic dublu, în care sunt inclavate proteine derivate din celulă, precum și proteine codificate de virus. Fosfolipidele și proteinele de origine celulară sunt diferite în funcție de tipul de celulă în care a avut loc replicarea virală. Cele mai multe glicoproteine ale peplosului sunt codificate de genomul viral.

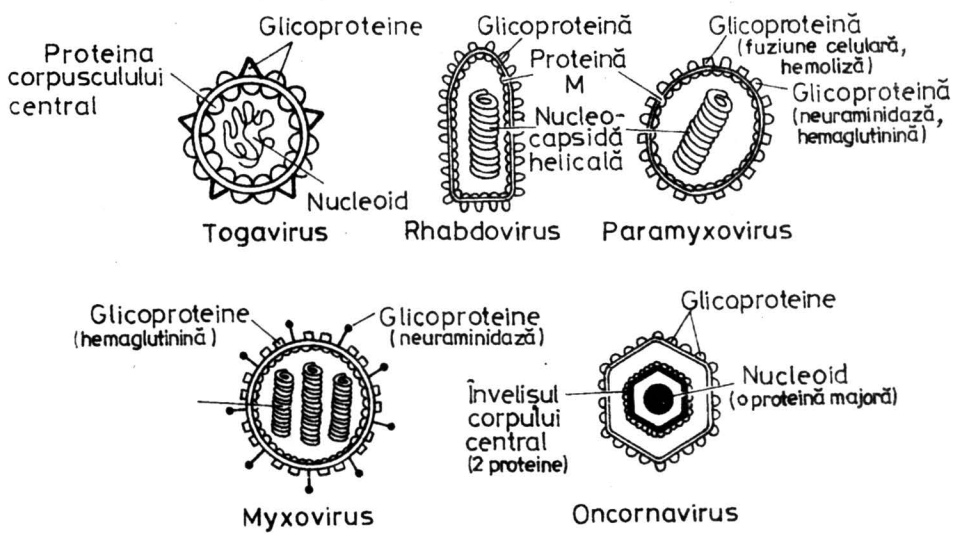


Fig. 106. Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de înveliș la virusurile cu genom ARN monocatenar (modificat după Casjens și King, 1975).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Glicoproteinele codificate de virusuri sunt constituienţii universali ai peplosului, dar diversitatea lor biochimică este foarte limitată (unul sau câteva tipuri pentru un virus). Greutatea moleculară a glicoproteinelor este cuprinsă între 10 şi 100 kD, iar conţinutul glucidic, între 5 şi 40%. Aceste molecule sunt formate dintr-un ax polipeptidic, iar componenta glucidică constituie catene laterale de N-acetilglucozamină, manoză, fucoză, acid neuraminic. Glicozilarea proteinelor virale este catalizată de transferazele celulare.

Cele mai cunoscute glicoproteine virale sunt *spiculele*, inclavate în peplos. Spiculele sunt prelungiri proeminente la suprafaţa peplosului. Cele mai studiate sunt spiculele din învelişul mixovirusurilor, cu funcţie de hemaglutinine şi neuraminidază. Originea lor este mixtă: componenta proteică este codificată de virus, iar glicozilarea este catalizată de enzimele celulare, în timp ce proteina parcurge drumul de la locul sintezei, până la nivelul membranei.

Lipidele (sub forma glicolipidelor sau a fosfolipidelor) sunt încorporate în învelişul viral în timpul înmuguririi din membranele celulare. Învelişul viral are un conţinut semnificativ mai înalt de colesterol, comparativ cu membrana citoplasmatică.

Pentru majoritatea virusurilor învelite (*Herpes-, Toga-, Rhabdo-, Myxo, Oncornavirus*), componentele moleculare ale învelişului sunt încorporate în membrane celulare preformate. La *Pox-* , *Iridovirus* şi lipofagi, învelişul viral se asamblează într-un mod mai puţin cunoscut.

Semnificaţia biologică a capsidei şi a învelişului extern. Capsida îndeplineşte un rol protector esenţial pentru genomul viral, acoperindu-l integral. Participă la procesele de adsorbţie şi fixare a virionului pe suprafaţa celulei sensibile.

Învelişul extern consolidează funcţiile capsidei, protejează nucleocapsida şi asigură o structură mai compactă a virionului. Spiculele proeminente pe suprafaţa peplosului favorizează fazele de adsorbţie şi fixare a virionului în procesul infecţios.

Virionii alcătuiţi numai din genom şi capsidă, cărora le lipseşte învelişul extern, sunt caracteristici virusurilor nude (*Picorna-, Reo-, Adenovirus).*

Genomul viral. Organizare fizică

Genomul viral este alcătuit dintr-o moleculă de acid nucleic – ADN sau ARN. Niciodată virionii nu conţin ambele tipuri de acizi nucleici. Virusurile al căror genom este alcătuit dintr-o moleculă de ADN aparţin grupului *dezoxiribovirusuri*, iar cele care au ca genom o moleculă de ARN formează grupul larg al *ribovirusurilor.*

Molecula de acid nucleic a genomului viral poate se fie *monocatenară sau dublu catenară, lineară sau circulară.* Faptul ca genomul unor virusuri este format dintr-o singură catenă de ADN s-a dedus din observaţia surprinzătoare, ca determinările cantitative ale adeninei nu sunt echivalente cu ale timinei, iar cantitatea de guanină nu este egală cu cea de citozină.

Moleculele genomice de ADN *monocatenar*, lineare sau circulare au o tendinţă foarte accentuată de a se plia, formând bucle dublu catenare în ac de păr, ori de câte ori secvenţele de baze permit formarea unui număr semnificativ de perechi, reunite prin intermediul punţilor de H. Circa jumătate din bazele de ADN monocatenar sunt legate prin punţi de H, astfel încât molecula este foarte *compactă*. Odată cu formarea parţială a unei catene duble, molecula se pliază. Starea pliată este favorabilă unei împachetări optime, deoarece permite o stivuire mai eficientă a suprafeţelor hidrofobe ale bazelor.

Gradul de împerechere a bazelor şi implicit de pliere a moleculei, se modifică în prezenţa ionilor. Ionii de Na^+ (0,01 M), neutralizanţi ai sarcinilor negative ale bazelor favorizează predominanţa formei monocatenare, cu foarte puţine bucle, datorită acţiunii de respingere a grupărilor fosfat cu sarcină negativă.

Genomul viral *dublu catenar*, din punct de vedere topologic (al configuraţiei spaţiale) poate fi linear sau circular închis, cu diferite grade de supraspiralizare şi corespunzător, cu un grad mai mare sau mai mic de condensare.

Majoritatea virusurilor infecţioase pentru om şi animale au ca genom o moleculă de ARN. Peste 90% dintre virusurile infecţioase pentru plante, aparţin *ribovirusurilor*, genomul lor fiind alcătuit dintr-o moleculă ARN mono- sau dublu catenar.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 107. Tipurile structurale de virusuri infecțioase pentru celulele animale și umane (după Mathews, 1979).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

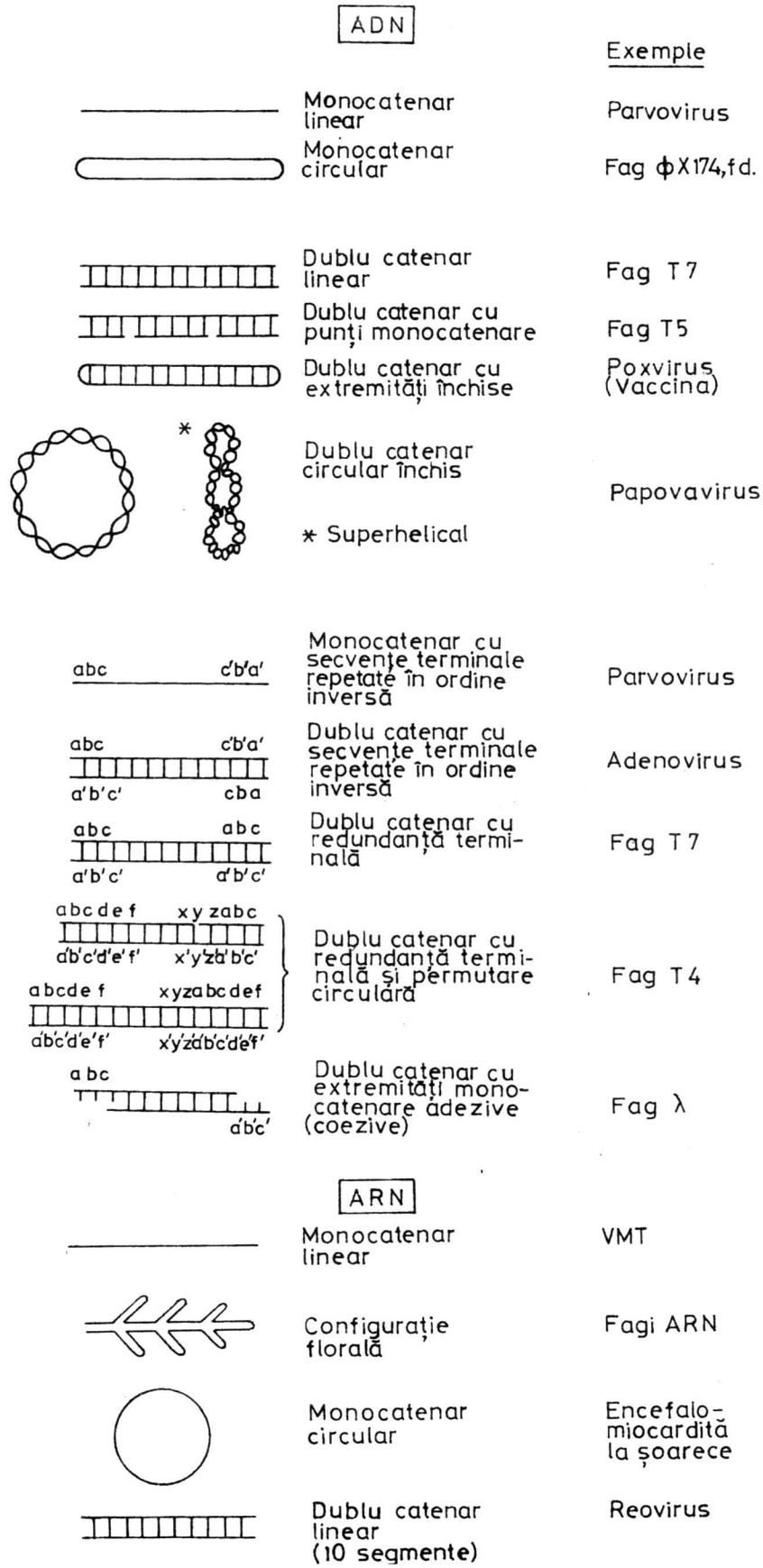


Fig. 108. Diferite tipuri de structură a genomurilor ADN și ARN virale și particularitățile secvențelor nucleotidice terminale (a, a'; b, b' sunt secvențe complementare, modificat după Luria, 1978).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În virion, genomul ribovirusurilor este asociat cu nucleoproteine şi cu proteine de replicare (ARN-polimeraze), dar se disociază de nucleoproteine, după ce a fost înglobat în citoplasma celulei gazdă.

Genomul dezoxiribovirusurilor este complexat cu proteine, atât în starea împachetată în virion, cât şi ca genom liber în celula infectată. ADN al virusului simian 40(SV_{40}) este permanent condensat în 24 de nucleosomi, care conţin histone, identice cu cele din celula gazdă. La adenovirusuri, ADN în virion este asociat cu proteine proprii, dar după decapsidare în celula infectată, proteinele proprii se disociază şi sunt înlocuite cu proteine histonice.

Dimensiunile genomului ribovirusurilor sunt relativ uniforme, variaţiile fiind în limita a 30 de ori: genomul *virusului hepatitei delta* are greutatea moleculară de 500 kD[1] (1678 nucleotide). Este cel mai mic genom viral şi în ciclul replicării este dependent de virusul hepatitei B. Cel mai mare genom ARN este acela al *reovirusurilor* (15 000 kD).

Genomul dezoxiribovirusurilor are o scară de variaţie dimensională mai largă, de la 1 la 185. Cel mai mic genom este al *virusului hepatitei B* (1000 kd – 3 200 nucleotide), iar cel mai mare este al *avipoxvirusului* (185 000 kD).

Uneori, virionii unui preparat prezintă variaţii ale cantităţii de ARN genomic. De exemplu, la paramixovirusuri, un virion poate să conţină mai multe copii ale genomului viral. Alteori, particulele virale pot fi "goale"(lipsite de genom) sau includ numai un fragment de genom. Din genom lipsesc diferite secvenţe genice, uneori chiar cele care condiţionează replicarea virală. Aceştia sunt virioni defectivi şi în ciclul replicării sunt dependenţi de prezenţa în celulă, a unor virusuri "helper" (ajutătoare), care suplinesc defectele genetice ale virionilor defectivi.

Modalităţi particulare de codificare a informaţiei genetice la virusuri

Virusurile prezintă o diversitate proprie de sisteme genetice, neîntâlnită la sistemele celulare.

Majoritatea ribovirusurilor au ca genom o moleculă de ARN monocatenar de polaritate pozitivă[x] sau de polaritate negativă[xx]. Numai membrii familiei *Reoviridae* au ca genom o moleculă de ARN dublu catenar.

Raportul dintre greutatea moleculară a genomului şi a produsului dc sinteză este de circa 10/1 pentru genomul monocatenar şi 20/1 pentru cel dublucatenar. Valoarea foarte mică a acestui raport se datorează existenţei unor mecanisme moleculare care permit utilizarea cu maximă eficienţă a informaţiei genetice conţinută în genom.

Genomul de dimensiuni mici prezintă avantajul de a fi transcris şi tradus mai rapid şi mai fidel.

Datorită dimensiunilor mici ale genomului lor, virusurile fac economie de informaţie genetică, utilizând mai multe strategii de codificare. Noţiunea de "strategie" semnifică modalităţile de organizare şi funcţionare a informaţiei genetice care permit utilizarea informaţiei genetice cu randament optim.

1. Virusurile codifică sinteza unei varietăţi foarte limitate de proteine. Capsida este formată din molecule proteice de acelaşi tip, sau dintr-un număr mic de tipuri de proteine diferite, la care se adaugă alte câteva tipuri de proteine asociate genomului. Asociate peplosului, se găseşte un număr restrâns de glicoproteine.

2. Pentru realizarea unor funcţii proprii, unele virusuri utilizează molecule ce aparţin total sau parţial celulei gazdă: de exemplu, enzima de replicare (ARN-polimeraza) a fagului Q-beta (un fag ARN) este alcătuită din 4 subunităţi polipeptidice, din care una este codificată de virus, iar celelalte trei aparţin celulei.

3.Unele polipeptide virale îndeplinesc funcţii multiple, având atât rol *structural* (adică sunt proteine care intră în alcătuirea virionului) cât şi rol *reglator*.

---

[1] Un dalton este egal cu masa atomului de hidrogen, adică 1,672649 x 10^{-24}g . 1 kD = 1000 D.

[x] Genomul ARN de polaritate pozitivă funcţionează ca ARNm şi este tradus în proteine, fără să necesite o etapă prealabilă de transcriere.

[xx] Genomul ARN de polaritate negativă nu este tradus direct, ci este mai întâi transcris în ARNm.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4. In ciclul de multiplicare, unele virusuri utilizează informaţia genetică a virusurilor *helper*. Virusurile helper suplinesc anumite deficienţe funcţional-replicative ale virusului defectiv. Virusurile defective nu se pot replica până la stadiul de virus matur, deoarece le lipsesc genele codificatoare ale proteinelor structurale sau genele reglatoare ale morfogenezei. De exemplu, adenovirusurile au funcţia de helper pentru replicarea unor parvovirusuri (*A*deno-*A*ssociated-*V*iruses – *AAV*), iar virusul hepatitei B are rol helper pentru replicarea virusului delta.

5. Virusurile utilizează mai multe modalităţi de transmitere a informaţiei genetice de la genom la proteine, prin intermediul ARNm. Ele depăşesc condiţiile restrictive ale cantităţii limitate de informaţie genetică, impusă de dimensiunile reduse ale capsidei, prin existenţa *genelor suprapuse*. Suprapunerea genică semnifică faptul ca o secvenţă de ADN poate să codifice mai mult decât o proteină. Fenomenul suprapunerii se realizează pe mai multe căi:

- înădirea aceloraşi secvenţe codificatoare ale moleculei de ARNm în succesiuni diferite:
- iniţierea traducerii mesajului la sau chiar la trei situsuri diferite;
- modificarea cadrului de citire în timpul transcrierii informaţiei genetice.

Unele din aceste mecanisme sunt condiţionate de existenţa fenomenului de *înădire* (splicing). La virusurile infecţioase pentru celulele animale, informaţia genetică are caracter *discontinuu*, aşa cum este şi a gazdelor lor.

Fenomenul de înădire (splicing) a secvenţelor informaţionale neadiacente de acid nucleic, s-a identificat iniţial la adenovirusuri, dar acum este recunoscut ca fiind universal şi are loc fie în timpul sintezei ARNm sau, în genomul eucariot, ca rezultat al rearanjării genelor prin fenomene de transpoziţie în timpul diferenţierii celulare.

Echipamentul enzimatic care catalizează prelucrarea ARNm prin clivare şi înădire, este localizat în nucleu şi în consecinţă, mecanismul înădirii genice poate fi activ numai la virusurile care au o fază nucleară a ciclului de replicare (adeno, herpes, papova, influenza).

Unele virusuri *schimbă cadrul de citire a informaţiei în timpul traducerii* (frame shifting), iniţiind sinteza proteică la noi situsuri de traducere a ARNm (open reading frames – ORF). Prin iniţierea traducerii mesajului la două sau chiar trei situsuri diferite, aceiaşi secvenţă de nucleotide este tradusă în două sau trei proteine distincte. Ribosomii au capacitatea intrinsecă de a schimba cadrul de citire în timpul traducerii mesajului, pe care unele virusuri o exploatează pentru a diversifica setul de proteine pe care le sintetizează. S-a sugerat că subunitatea 40S a primului ribosom angajat în traducerea ARNm, se fixează la primul codon de iniţiere a traducerii (AUG). Restul ribosomilor alunecă pe molecula de ARNm, până la următoarea tripletă de iniţiere AUG, de unde reîncepe traducerea mesajului. De exemplu, în timpul traducerii mesajului pentru proteina *gag* a virusului sarcomului Rous, 5% din ribosomi îşi schimbă cadrul de citire pentru a sintetiza proteina *gag-pol*. Secvenţe specifice ale ARNm viral, favorizează alunecarea ribosomilor, astfel încât se sintetizează şi mici cantităţi de revers-transcriptază (RT).

Modificarea cadrului de citire în timpul transcrierii informaţiei genetice este rezultatul unor *procese mutaţionale punctiforme*, ceea ce permite transcrierea mesajului în două sau chiar trei cadre de citire. Prin deleţia sau adiţia unei singure baze, o secvenţă de nucleotide codifică proteine diferite. De exemplu, un polimer sintetic cu secvenţa repetitivă CTG CTG ..... CTG codifică sinteza poli-asparaginei. Defazarea la dreapta cu o singură bază a aceleiaşi secvenţe formează tripleta repetitivă TGC TGC .... TGC, care codifică poli-arginina, iar cadrul defazat cu două baze la dreapta produce tripleta GCT GCT...GCT, care codifică poli-treonina. Cadrul al III-lea de citire semnifică revenirea la mesajul iniţial.

In ciuda diversităţii strategiilor funcţionale ale genomului viral, universalitatea codului genetic nu este încălcată, deşi anumiţi codoni pot avea o frecvenţă superioară.

Studiile de genetică virală au adus o contribuţie de o valoare deosebită la definirea unor noţiuni fundamentale. Analiza modului în care este codificată şi transmisă informaţia genetică, la virusurile infecţioase pentru celula animală, a dat o definiţie mai flexibilă noţiunii de *genă*, ca rezultat al descoperirii că aceiaşi secvenţă de ADN sau ARN poate să specifice (să codifice) mai mult decât un produs genic. Conceptul vechi, "o genă = o enzimă" a fost înlocuit cu definiţia

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mai corectă, "o genă codifică un lanţ polipeptidic (un monomer proteic)". Datorită suprapunerii genice, fenomen descoperit la virusuri, genomul nu mai poate fi considerat ca o succesiune lineară de unităţi codificatoare independente.

Descoperirea caracterului discontinuu al informaţiei genetice este de asemenea, rezultatul studiului genetic al virusurilor infecţioase pentru celula umană şi animală.

Una din marile contribuţii ale virologiei animale la dezvoltarea stiinţelor biologice în general şi a biologiei moleculare în special, a fost descoperirea şi caracterizarea *enzimei revers-transcriptază* a retravirusurilor. Pentru prima dată a devenit evident ca transferul informaţiei genetice în sistemele biologice nu se face exclusiv pe filiera ADN → ARN → proteine, ci în anumite situaţii, informaţia genetică poate fi transmisă în sensul ARN → ADN → ARN → proteine. A fost astfel infirmată *dogma centrală a biologiei moleculare*, care susţinea transmiterea unidirecţională a informaţiei genetice.

Pe de altă parte, enzima revers-transcriptază a devenit unul din instrumentele foarte importante ale biotehnologiilor bazate pe clonare şi secvenţiere. S-a lărgit cadrul de aplicare a metodologiei ingineriei genice. A devenit posibilă propagarea copiilor ADN ale genomului viral ARN, precum şi a copiilor ADN obţinute prin reverstranscrierea ARNm celular.

Genomuri virale ARN segmentate (divizate, multipartite)

Unele ribovirusuri, infecţioase pentru organismul animal, precum şi altele infecţioase pentru plante au genomul alcătuit din mai multe segmente. Ribovirusurile cu genom segmentat, infecţioase pentru om şi animale (virusurile gripale, reo- şi arenavirusurile) se caracterizează prin faptul că toate segmentele genomului sunt încorporate într-o capsidă comună.

Virusurile gripale au genomul alcătuit din 8 şi respectiv 7 segmente de ARN monocatenar. La *Arenaviridae*, genomul este format din două segmente inegale (*L* = *L*arge = 2 x 10^6 D şi *S* = *S*mall = 10^6 D). La reovirusuri, genomul are caracter de unicitate, fiind format din 10 segmente de ARN dublu catenare. La toate cele trei familii de virusuri, segmentele de ARN sunt *distincte*, adică se deosebesc prin secvenţa nucleotidelor şi nu provin prin fragmentarea unei molecule mari. Dovada caracterului lor distinct este că moleculele nu hibridează unele cu altele şi că fiecare este transcrisă în ARNm specific şi codifică sinteza unei proteine.

Ribovirusurile cu genom segmentat, infecţioase pentru plante (*Tobra-, Bromo-, Como-, Nepo-, Cucumovirus*) au au o particularitate distinctă: segmentele genomului lor nu sunt încorporate în aceiaşi capsidă virală, ci sunt distribuite individual în capside separate. Pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare virală este necesară infecţia simultană cu toate particulele virale care constituie complementul genomic. Virusul mozaicului lucernei (alfalfavirus) are genomul segmentat, repartizat în 4 tipuri de virioni: trei au formă de bastonaş, fiecare având câte o moleculă de ARN, iar al IV-lea, de formă elipsoidală conţine două segmente de ARN.

Avantajul genomului segmentat constă în aceea că mesajele genetice mai mici sunt mai uşor replicate şi transmise în celula eucariotă animală sau vegetală. Pentru virusurile cu genom segmentat repartizat în mai multe capside, faptul pare dezavantajos pentru iniţierea replicării, dependentă de toate segmentele genomice încapsidate separat, dar în realitate, în procesul infecţios se eliberează cantităţi imense de particule virale, care asigură şansa transmiterii tuturor particulelor ce conţin un complement genomic.

Semnificaţia biologică a genomului viral

Informaţia genetică virală conţine determinanţi genetici care asigură desfăşurarea ciclului de replicare în celula gazdă sensibilă: replicarea genomului, informaţia genetică necesară devierii metabolismului celulei gazdă, în sensul sintezei componentelor virale, genele pentru sinteza proteinelor structurale şi reglatoare, precum şi genele care asigură asamblarea şi eliberarea virionilor progeni din celula gazdă.

Genomul viral condiţionează patogenitatea şi virulenţa virală şi asigură potenţialul de variabilitate a virusurilor. Variabilitatea este o proprietate esenţială pentru propagarea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

virusurilor în natură. Astfel, spiculele de hemaglutinină ale virusului gripal, prezintă o variaţie biochimică de la un sezon la altul, iar spiculele virusului imunodeficienţei umane (HIV), cu rolul de a fixa virionul pe receptorii membranari ai limfocitului T_{CD4}, au tendinţa spre o variaţie biochimică accentuată.

Infecţiozitatea acizilor nucleici virali

Desfăşurarea ciclului de replicare virală nu este condiţionată de ansamblul integrat al componentelor structurale ale virionului, ci în esenţă, numai de genomul viral şi uneori, de proteinele de replicare asociate acestuia. Infecţiozitatea acizilor nucleici virali s-a demonstrat iniţial pentru ADN fagic şi ulterior pentru ARN al VMT. Dacă acidul nucleic genomic funcţionează ca ARNm, infecţiozitatea sa este o proprietate fără excepţie. ARN genomic cu polaritate negativă, în stare pură nu este infecţios, deoarece este necesară transcrierea sa într-o copie de ARN complementar, cu rol de ARNm.

Infecţiozitatea acizilor nucleici virali nu mai este condiţionată de interacţiunea cu receptorii suprafeţei celulare. De aceea, spectrul celulelor infectate prin intermediul acizilor nucleici purificaţi creşte foarte mult, dar eficienţa procesului infecţios (numărul de molecule genomice infecţioase/celulă şi respectiv cantitatea de virus progen) diminuă semnificativ.

Definirea conceptului modern de virus

Noţiunea de virus a fost definită în cadrul conceptual actual de către A. Lwoff, pe baza stabilirii unor deosebiri distincte între "virus" şi "nevirus". Ca o consecinţă a unui mare număr de caractere discriminatorii faţă de sfera viului (care semnifică existenţa unor deosebiri absolute) pe care le posedă în comun, s-a conchis ca virusurile formează un grup particular de agenţi infecţioşi, reuniţi într-o categorie unică, distinctă de lumea vie, faţă de care asemănările şi afinităţile sunt minime, iar diferenţele şi deosebirile sunt fundamentale.

In tabelul următor sunt redate caracterele discriminatorii dintre virusuri şi bacterii.

Caractere	*Virusuri*	*Bacterii*
Unitatea Structurală	Virionul	Celula bacteriană
Stările posibile de existenţă	*Virionul* sau virusul infecţios matur (particula virală infectioasa). *Virus vegetativ*, adică genomul viral liber în celula infectată, care poate fi replicat. *Provirus*, sau genomul viral integrat în cromosomul celulei gazdă.	*Celula* bacteriană (forma vegetativă), capabilă de diviziune. *Sporul* bacterian (forma facultativă de diferenţiere).
Structura internă	Genomul viral şi capsida, structuri esenţiale şi obligatorii formează împreună *nucleocapsida*. *Invelişul extern (peplosul)*, cu spicule hemaglutinante este o structură proprie numai la virusurile învelite.	Relativ complexă (structuri esenţiale şi accesorii): perete celular, membrana plasmatică, citoplasmă, nucleoid, ribosomi, vacuole, incluzii, spor, aparat fotosintetic, capsulă, flageli, pili, fimbrii.
Simetria la nivel molecular	Constantă, de tip helical, icozaedric sau binară (mixtă).	Absentă
Acizi nucleici	ADN sau ARN, niciodată ambii, cu localizare exclusivă în genomul viral	ADN, în cromosom şi plasmide. ARN, ca ARNm, ARNt şi ARNr, în citoplasma
Proteine	Număr fix de molecule de acelaşi tip (identice) sau aparţinând unui număr mic de tipuri diferite. Proteinele virale au rol structural (intră în alcătuirea capsidei) şi uneori au rol enzimatic (sunt proteine de replicare a genomului).	Număr mare de molecule, ce aparţin la 2-3 000 de tipuri diferite, cu rol structural şi funcţional.
Glucide	De regulă sunt absente. Se găsesc în peplosul viral sub forma glicoproteinelor şi sinteza lor este catalizată de glicozil-transferazele celulare.	Prezente în mod constant

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lipide	De regulă sunt absente. Se găsesc în peplos şi provin din membrana celulară la nivelul căreia are loc învelirea virionului	Prezente constant
Echipament enzimatic de biosinteză şi de catabolism	Absent. Uneori virionul conţine enzime cu rol de replicare sau enzime care favorizează pătrunderea virionului sau eliberarea sa din celulă. Lipsesc enzimele de biosinteză sau cele producătoare de energie.	Prezent constant
Capacitatea de sinteză a moleculelor cu potenţial energetic ridicat	Absentă	Prezentă constant
Capacitatea de sinteză independentă a constituienţilor chimici	Absentă	Prezentă
Capacitatea de creştere	Absentă	Prezentă constant
Capacitatea de diviziune	Absentă	Prezentă constant
Dependenţa de substratul viu pentru multiplicare	Se multiplică exclusiv în substratul celular viu, pornind uneori numai de la genom, iar alteori de la genom şi de la enzimele de replicare	Multiplicarea celor parazite este independentă de substratul viu, cu excepţia rickettsiilor şi chlamidiilor şi porneşte totdeauna de la ansamblul integrat al constituienţilor celulari.
Utilizarea sistemelor structurale şi biochimice ale gazdei în cur- sul parazitismului intracelular: - sistemul enzimatic Lipmann* -ARNt - ribosomii	Totdeauna	Bacteriile parazite –niciodată
Parazitism absolut	Constant şi obligatoriu	Absent
Tipul de organizare	Acelular	Celular

* Sistemul enzimatic Lipmann cuprinde enzimele care convertesc energia potenţială a moleculelor, în energie utilă; enzimele care catalizează sinteza proteică (cu participarea ribosomilor şi a ARNt); componentele catenei de respiraţie celulară.

Caracterele enumerate în tabel relevă câteva particularităţi cu totul speciale, proprii exclusiv virusurilor:

- Virusurile sunt entităţi infecţioase complexe şi organizate. Complexitatea derivă din faptul ca în structura unui virion se găsesc două componente esenţiale: una *genetică* (reprezentată de un acid nucleic) şi una de natură *proteică*. Uneori, componenta proteică nu este esenţială pentru exprimarea proprietăţilor sistemului, pentru că acidul nucleic în stare pură este infecţios. Caracterul înalt organizat al particulei virale rezultă din faptul că relaţiile spaţiale dintre cele două tipuri de constituienţi sunt definite şi constante
- Virionii nu au echipament enzimatic propriu, producător de energie. Uneori, virionul conţine enzime de replicare a genomului. Consecinţa este că virionul nu are metabolism, nu creşte şi nu se divide. In afară relaţiilor cu celula gazdă, virionul matur este o entitate inertă. Deoarece nu au metabolism propriu, virusurile nu se multiplică, ci sunt multiplicate (replicate) de celulă, pornind numai de la genomul viral şi nu de la ansamblul constituienţilor structurali. Infecţia virală este rezultatul pătrunderii în celulă, a virionului sau numai a acidului nucleic viral. Pentru sinteza componentelor virale este utilizat aparatul structural şi enzimatic al celulei infectate (ribosomii şi enzimele catalizatoare). Instrucţiunile programului genetic viral sunt executate numai în celula vie.
- Unităţile proteice – capsomerele – care acoperă genomul viral sunt aşezate după un model geometric cu simetrie riguroasă (helicală, icozaedrică sau mixtă), care nu există niciodată la microorganisme.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- Virusurile au o organizare *acelulară*, care le distinge net de tipul cel mai simplu al organizării celulare – bacteriile.

Aceste caracteristici definesc *parazitismul absolut* al virusurilor, *de nivel genetic*, fără echivalenţă pentru parazitismul microorganismelor, care poate fi cel mult *obligatoriu*, pentru cele care se multiplică numai în substratul celular viu (rickettsii şi chlamidii). Ele au propriul aparat de sinteză a macromoleculelor componente şi se multiplică prin diviziune, ponind de la ansamblul integrat al structurilor proprii.

Virusurile posedă anumite proprietăţi ale sistemelor vii (de exemplu, au un program genetic, se disemineză, sunt sensibile la acţiunea factorilor de mediu), dar *lipsa lor de autonomie* le plasează în afara sferei viului. Lipsa de autonomie semnifică incapacitatea lor de a se manifesta ca sisteme biologice de sine stătătoare, în afara interacţiunii cu substratul celular viu.

În evoluţie, *viul* începe numai după constituirea unui *program genetic*, dar calitatea fundamentală a viului este *capacitatea de autoreproducere*. Virusurile au un program genetic propriu, dar fără aparatul enzimatic de biosinteze, acizii nucleici rămân inerţi.

Simetria virusurilor

Simetria este definită de aranjarea ordonată şi repetată într-un ansamblu, a subunităţilor sale identice ca formă şi mărime, dispuse în jurul unui plan sau al unui ax.

Mult timp după descoperirea virusurilor şi după acceptarea naturii lor nucleoproteice s-a considerat ca genomul este acoperit de o moleculă proteică uriaşă. Într-o capsidă de dimensiuni medii, intră circa 330 000 de aminoacizi. Dacă fiecare aminoacid este codificat de trei baze, pentru edificarea structurii capsidei ar fi necesar un genom care să cuprindă circa un milion de nucleotide. Dar nici cele mai mari virusuri nu au un genom de asemenea dimensiuni. In cursul sintezei unei molecule proteice atât de mari, ar creşte mult şansa încorporării greşite a aminoacizilor, astfel încât moleculele proteice ar fi inutilizabile pentru morfogeneza virală. Ineficienţa asamblării ar fi un dezavantaj incompatibil cu cu perpetuarea virusurilor în natură.

Watson şi Crick (1956) au adus dovada că genomul viral, datorită dimensiunilor sale reduse nu poate codifica sinteza unei molecule mari şi nici sinteza unui număr mare de proteine diferite. Ei au emis ipoteza că genomul viral este acoperit de o capsidă formată dintr-un număr mare de *molecule identice, dispuse după o arhitectură riguros simetrică*. Ipoteza a fost verificată prin metode biochimice, de analiză a greutăţii moleculare a proteinelor capsidale şi a compoziţiei lor în aminoacizi.

În natură există exemple de structuri cu *simetrie moleculară*: toate cristalele au moleculele componente aşezate simetric. Ele au inspirat pe autorii modelului aşezării simetrice a moleculelor capsidei virale.

În structura moleculară a capsidei, intră un număr fix de molecule proteice de acelaşi tip, sau un număr limitat de tipuri diferite, dispuse obligatoriu într-o aranjare simetrică. Ca şi în structura cristalelor, ele au o aranjare perfect ordonată.

Watson şi Crick au dedus că dintre toate tipurile de simetrie cunoscute, numai simetria helicală şi cea cubică, permit împachetarea ordonată a subunităţilor componente, realizând simultan şi condiţia obligatorie a identităţii ambianţei lor chimice. La baza simetriei moleculare a cristalografiei geometrice stă *principiul echivalenţei*. Conform acestui principiu, oricare din componentele unei structuri cu organizare simetrică, trebuie să se afle în ambianţa unor componente echivalente. Deoarece elementele de construcţie ale capsidei virale (capsomerele), uneori nu sunt perfect identice (unele sunt trimere, altele sunt pentamere), iar pe altă parte, moleculele mari sunt uşor deformabile, principiul echivalenţei este încălcat şi se aplică principiul *cvasiechivalenţei*.

S-au descris trei tipuri de simetrie virală:

- *simetria helicală* (la virusul mozaicului tutunului, la mixovirusuri, paramixo-, rhabdovirusuri etc.);
- *simetria icozaedrică* (la polio-, adeno-, herpesvirusuri);
- *simetria mixtă*, la fagii din seria T par (capul are simetrie icozaedrică, iar coada are simetrie helicală).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Simetria helicală

Simetria helicală este definită de aşezarea unităţilor componente în jurul unui ax, care este supus unei mişcări de *rotaţie* şi unei mişcari de *translaţie*, paralelă cu acelaşi ax (mişcarea este similară unui şurub). Capsomerele sunt aşezate în mod repetat, având poziţii rezultate din cele două tipuri de mişcare simultană în jurul axului şi paralelă cu acesta, astfel încât definesc o suprafaţă cilindrică, cu o structură helicală.

Unele virusuri au nucleocapside helicale *flexibile*, ceea ce le permite sa dobândească o formă sferică (izodiametrică, după ce sunt învelite de peplos, sau o formă lineară flexuoasă, dacă sunt nude (de exemplu, unii bacteriofagi). Cele cu nucleocapsidă *rigidă* au formă cilindrică.

Dintre virusurile cu simetrie helicală, cu nucleocapsida rigidă, cel mai cunoscut este VMT. Diametrul extern al cilindrului este de 18 nm, iar cel intern, de 4 nm. Lungimea cilindrului este de 300 nm. Capsida este alcătuită din 2130 capsomere identice, formate la rândul lor dintr-o singură unitate proteică (sunt capsomere monomere), cu greutatea moleculară de 17 500 D, fiecare proteină având 158 aminoacizi, a căror secvenţă este cunoscută. Genomul său este o moleculă de ARN monocatenar, lineară, cu greutatea moleculară de 2 x 10^6 D, aşezat în zona centrală a virionului, inclavat între capsomere. Configuraţia spaţială a genomului este o spirală cu diametrul de 8 nm (mai mare decât diametrul intern al cilindrului). Din această cauză, spirele de ARN genomic se inclavează şi se inseră printre moleculele proteice capsidale, deoarece acestea sunt deformabile, nefiind corpuri geometrice perfecte. Fiecare capsomeră are raporturi spaţiale cu trei nucleotide. Fiecare tur de helice a ARN conţine 49 de nucleotide, care se găsesc în raporturi spaţiale cu 16,3 molecule proteice, aşezate helical.

Unele virusuri nude, cu simetrie helicală au aspectul unor filamente flexibile şi o structură tubulară mai laxă (fagii filamentoşi). O serie de virusuri infecţioase pentru om şi animale prezintă o nucleocapsidă cu un grad foarte accentuat de flexibilitate, astfel încât virionul ia forma sferică. Faptul se explică prin flexibilitatea individuală a fiecărei capsomere, evidenţiată la paramixovirusuri. Cele mai reprezentative virusuri cu capsidă helicală flexibilă aparţin familiilor *Orthomyxo, Paramyxo-* şi *Rhabdoviridae.*

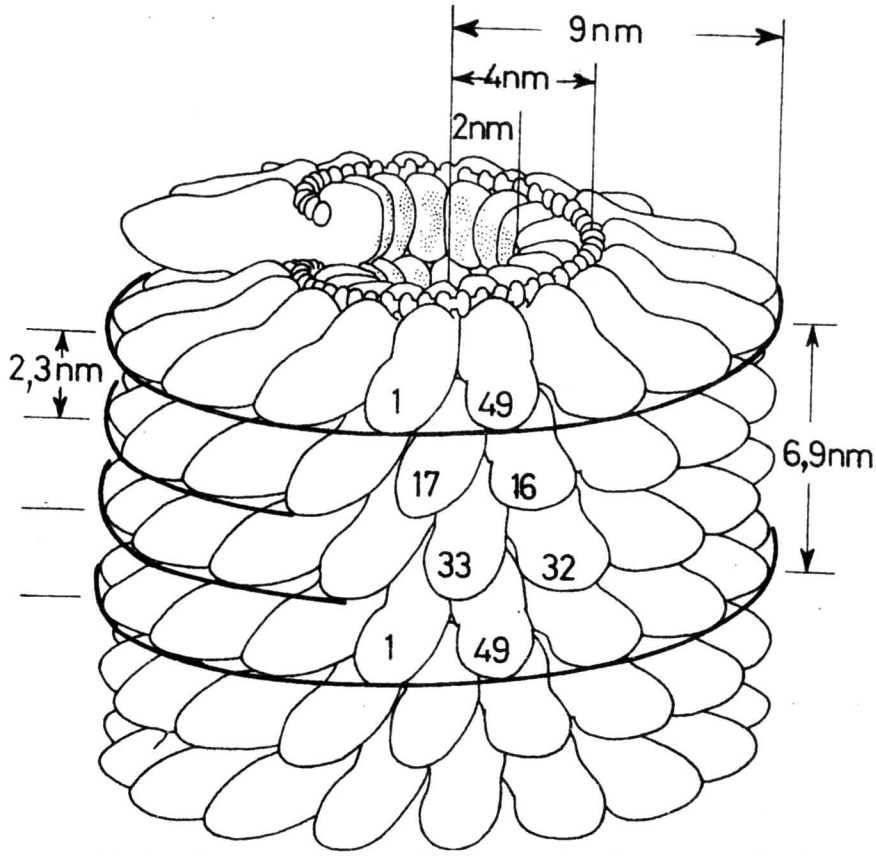


Fig. 109. Reprezentarea schematică a unei porţiuni din virionul de VMT.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Simetria icozaedrică

Virusurile cu simetrie icozaedrică au fost considerate ca având o formă sferică (izodiametrică), deoarece pe imaginile electrono-optice, la o mărime moderată, aspectul lor este sferic. In realitate, aceste virusuri au un contur hexagonal, datorită capsidei lor poliedrice, cu un înalt grad de organizare, constituită din capsomere aşezate după o simetrie riguroasă.

Virionii cu simetrie icozaedrică, în aparenţă de formă sferică, sunt constituiţi din capsomere asimetrice (neidentice), aşezate în jurul axelor de simetrie.

Spre deosebire de VMT, la care unitatea proteică este în acelaşi timp şi unitate de structură, la virusurile cu simetrie icozaedrică, unităţile morfologice vizibile la microscopul electronic (capsomerele) sunt alcătuite din câteva (3-5) subunităţi proteice. Ca urmare, ambianţa fiecărei subunităţi şi legăturile cu vecinele sale nu sunt perfect identice, ci aproximativ echivalente sau *cvasiechivalente* (Caspar şi Klug, 1962).

Conturul hexagonal foarte regulat al virusurilor sferice, aşa cum apare la microscopul electronic la măriri înalte, sugerează ideia că forma lor ar fi apropiată de aceea a unui corp solid cu toate feţele identice, cu toate laturile şi unghiurile egale. Din cele 5 corpuri solide euclidiene care răspund acestor condiţii şi anume, *tetraedrul, cubul, octaedrul, dodecaedrul şi icozaedrul*, ultimul dă un profil hexagonal al umbrei sale, în cele mai multe orientări ale fasciculului de lumină.

Simetria icozaedrică a virusurilor "sferice" a fost clarificată după mai multe experienţe şi demonstraţii intuitive. În microscopia electronică s-a utilizat pe scară largă, tehnica de umbrire a preparatului viral, adică acoperirea sa cu un strat monoatomic de metal (aur) pulverizat. Astfel, dimensiunile particulelor virale se măresc artificial. Metalizarea măreşte densitatea virionilor la fluxul de electroni şi evidenţierea lor este mai uşoară. Williams şi Smith (1958) au demonstrat că umbrele proiectate de un icozaedru pe o suprafaţă plană pe care este aşezat şi iluminat din diferite unghiuri, corespund exact imaginii electrono-optice a virusului *Tipula iridescent* (patogen pentru larvele de insecte) umbrit prin metalizare. Expuse la fluxul de electroni, particulele virale icozaedrice, umbrite, nu dau o umbră sferică, ci o umbră care sugerează organizarea lor poligonală. Forma umbrei este diferită în funcţie de incidenţa fasciculului de electroni, dar totdeauna sugerează a fi dată de un poligon cu toate feţele identice, cu toate laturile şi unghiurile egale. Dintre cele 5 solide analizate, iluminate în aceleaşi condiţii sub diferite unghiuri de incidenţă, umbra dată de virionii umbriţi prin metalizare se aseamănă cel mai mult cu umbra rezultată după iluminarea laterală a *icozaedrului*. Icozaedrul este un poliedru regulat cu 20 de feţe, toate triunghiuri echilaterale (*eicosi*, grec = 20), 30 de muchii (creste) şi 12 vârfuri (vertexuri). El are cel mai înalt tip de simetrie, caracterizat ca fiind de tip 5: 3 :2, deoarece are 6 axe de simetrie rotaţională de ordinul 2.

Virusurile "sferice" prezintă şi ele o simetrie de ordinul 5: 3: 2, deoarece capsomerele lor stau pe /sau în jurul axelor de simetrie de tip 5: 3: 2 ale unui icozaedru. In natură există exemple similare. De exemplu, simetria de ordinul 5 este cea mai frecventă la flori. Trepiedul unui aparat fotografic are un ax de simetrie de tip 3. O scară în formă de spirală prezintă o simetrie rotaţională de tip 2 în jurul axului sau central.

Probleme legate de modul de construcţie a virionilor icozaedrici

Descoperirea simetriei icozaedrice a virionilor "sferici" ridică o serie de probleme privind modul în care poate fi construită o astfel de structură. In acest sens s-au elaborat o serie de ipoteze, fără ca până astăzi sa se fi ajuns la o concepţie unitară.

Microscopia electronică a demonstrat în cazul virusurilor din această categorie, existenţa a două tipuri de capsomere, având 5 şi respectiv, 6 laturi (pentoni şi hexoni), rezultând la rândul lor, din aranjarea smetrică a unor unităţi de construcţie mai mici. Problema construcţiei particulei virale constă deci, în a identifica modul în care capsomerele de formă penta- şi hexagonală se pot aranja simetric pentru a acoperi o suprafaţă închisă, alcătuind un fel de cutie icozaedrică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Încercând să explice această construcţie, Caspar şi Klug (1962) au recurs la unul din principiile de geometrie aplicată de arhitectul B. Fuller în construcţia domului geodezic. În proiectul de plan (realizat în construcţie), pentru cupola domului, Fuller a divizat suprafaţa unei sfere, în faţete triunghiulare echilaterale, în raporturi cvasiechivalente, aranjate după o simetrie icozaedrică. Procedeul triangulării sferei oferă soluţia optimă pentru asamblarea unei cutii închise, construită din unităţi identice de structură. Un grad comparabil de cvasiechivalenţe nu poate fi realizat prin nici un alt model de subdivizare a suprafeţei unei sfere, deoarece creează tensiuni net superioare.

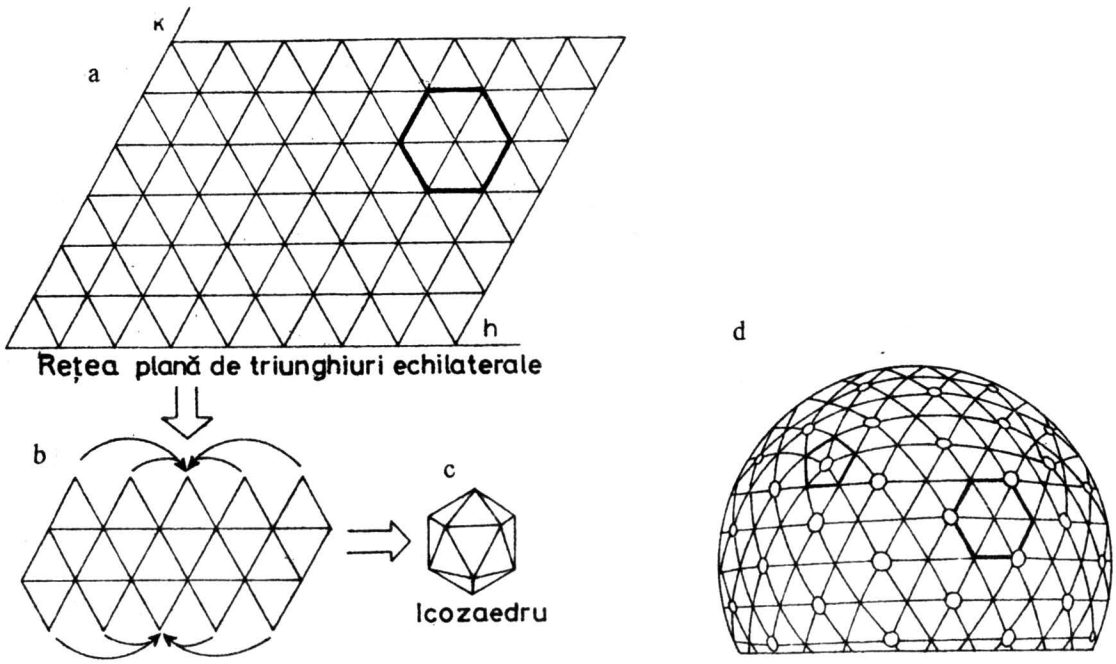


Fig. 110. a. Reţeaua plană de triunghiuri echilaterale (izometrice). b. Prin plierea a douăzeci de triunghiuri echilaterale, rezultă icozaedrul (c). Săgeţile simple indică direcţia în care se face apropierea vertexurilor. d. Reprezentarea schematică a domului geodezic al lui Fuller. Suprafaţa sa este alcătuită din faţete triunghiulare cvasiechivalente, grupate în hexamere sau pentamere, în jurul unor suprafeţe circulare mici.

Unităţile moleculare identice ale capsidei, în acord cu ipoteza lui Caspar şi Klug (1962), se leagă specific şi formează o structură stabilă şi simetrică, deoarece există un număr limitat de căi în care o anumită unitate poate fi legată de vecinele sale pentru a forma un număr maxim de legături stabile. Cea mai simplă situaţie este aceea întâlnită la cristale, care apar ca o reţea periodic tridimensională, în care, fiecare unitate este în raporturi echivalente cu vecinele sale. In cazul particulelor virale, moleculele capsidale, deşi identice, nu sunt în raporturi exact echivalente, ci numai cvasiechivalente. Aşezarea subunităţilor de construcţie în raporturi cvasiechivalente, face posibilă asamblarea unui număr redus de subunităţi mai mari într-o capsidă puţin mai deformată, dar păstrând simetria icozaedrică.

Pentru a închide icozaedrul, sunt necesare două tipuri de unităţi de construcţie: pentagonale şi hexagonale. Cele hexagonale sunt aşezate pe feţele şi pe muchiile icozaedrului, iar cele pentagonale, la vârfurile icozaedrului. Radiolarul *Aulonia hexagona* (descris de Haeckel) are scheletul calcaros, alcătuit din unităţi de formă hexa- şi pentagonală şi probabil a inspirat pe autorii acestui model de simetrie.

Relaţiile dintre genom şi capsidă, la virusurile icozaedrice sunt greu de explicat. În unele cazuri, genomul viral în asociaţie cu una sau cu mai multe proteine bazice, formează regiunea centrală ("core") a nucleocapsidei cvasisferice. Alteori, (la herpesvirusuri) genomul ADN este răsucit pe o structură formată din proteine fibrilare, rezultând o structură toroidală. La adenovirusuri, genomul are interacţiuni ferme cu proteinele capsidale, ceea ce conferă stabilitate maximă structurii nucleocapsidice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

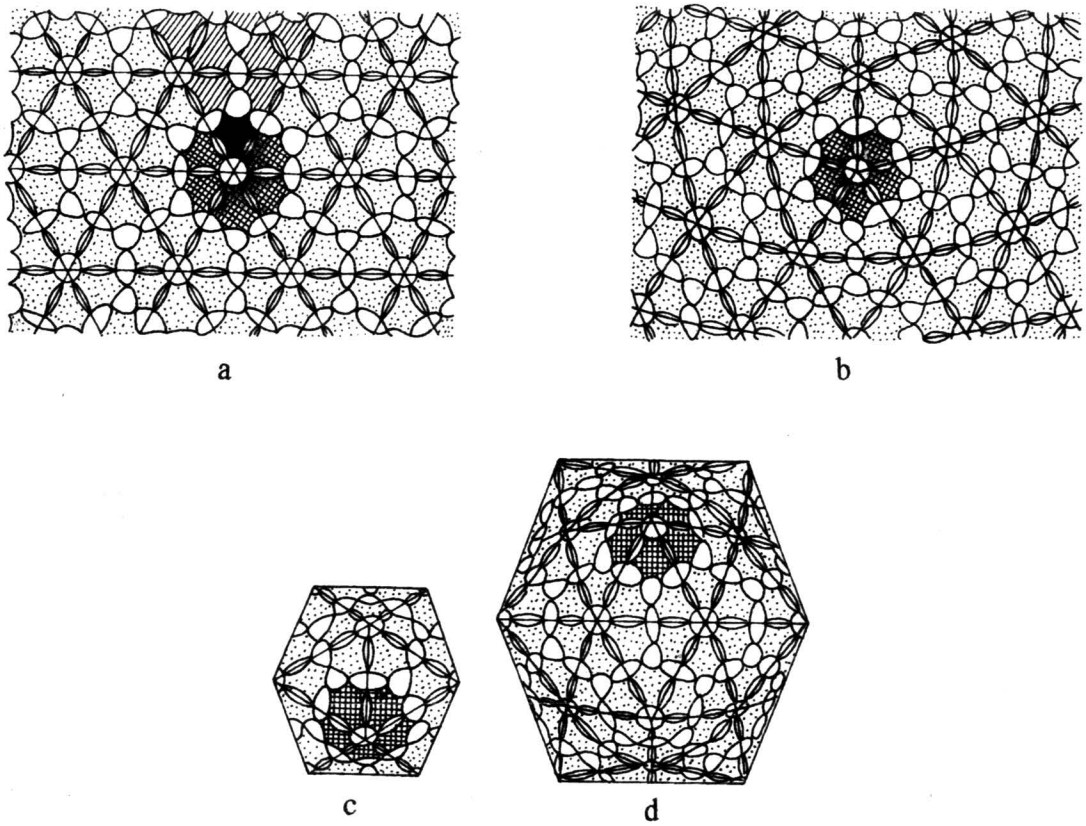


Fig. 111. Reprezentarea schematică a modului de construcție a virionilor cu simetrie icozaedrică. A. Construcția capsidei virale poate fi reprezentată schematic ca provenind dintr-o rețea hexagonală formată din grupuri de câte 6 subunități de construcție (hexamere). B. Îndepărtarea unui sector de 60° din această rețea, urmată de reunirea marginilor libere duce la formarea unui con, în vârful căruia un hexamer este înlocuit cu un pentamer. C. Dacă fiecare hexamer este transformat într-un pentamer, rezultă un icozaedru format din 60 subunități de construcție, reprezentând capsida virală cea mai mică, ce poate fi construită după acest model. D. Capsida virală formată din 180 subunități de construcție, alcătuită pe același principiu, dar având în structură, pe lângă pentamere, și 20 de hexamere.

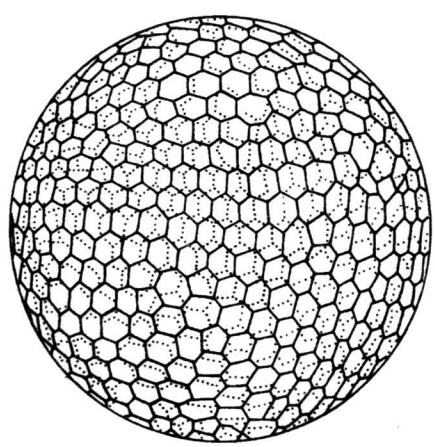


Fig. 112. Scheletul de siliciu al radiolarului *Aulonia hexagona*, având aspectul unui model hexagonal îmbrăcat pe o sferă. Printre ochiurile hexagonale ale rețelei sunt intercalate pentagoane. În lipsa pentagoanelor, o rețea hexagonală nu poate acoperi o sferă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cele mai importante familii de virusuri cu simetrie icozaedrică, din punct de vedere practic (clinic) şi teoretic sunt picorna-, adeno- şi herpesvirusurile. Caracteristicile lor structurale şi funcţionale sunt prezentate sumar în acest capitol.

Simetria icozaedrică prezintă avantaje funcţionale importante, evidenţiate prin eficienţa replicării virale. Virusurile icozaedrice pot fi asamblate cu o mai mare economie de proteine, deoarece oferă posibilitatea împachetării şi condensării genomului într-un spaţiu mai restrâns, comparativ cu cele helicale. De exemplu, genomul ARN al virusului mozaicului galben al napului este acoperit de 180 de molecule proteice, dispuse după o simetrie icozaedrică, în timp ce genomul VMT, de dimensiuni echivalente este acoperit de o capsidă alcătuită din 2130 capsomere. Alte avantaje sunt legate de uşurinţa asamblării particulei virale şi mai ales de stabilitatea structurii care rezultă.

Simetria complexă

Simetria complexă sau binară este prezentă în modul cel mai evident la bacteriofagii cu coadă contractilă (de exemplu, fagii din seria T-par, care infectează *E. coli*), a căror structură formează un adevărat dispozitiv pentru injectarea ADN în celula bacteriană: capul are o simetrie *icozaedrică*, în timp ce capsomerele cozii sunt ordonate după o simetrie *helicală*. Amănuntele referitoare la arhitectura moleculară a fagilor vor fi prezentate ulterior în acest capitol.

Multiplicarea (replicarea) virusurilor

Multiplicarea este procesul complex în cursul căruia are loc transcrierea şi traducerea informaţiei genetice în proteine, replicarea genomului şi asamblarea virionilor progeni.

Procesul replicării virale prezintă particularităţi care decurg din parazitismul absolut, de nivel genetic, al acestor entităţi. Replicarea are loc exclusiv în celulele vii, care furnizează nu numai precursorii monomerici ai macromoleculelor, ci şi întregul dispozitiv celular efector (ribosomi, enzime activatoare ale aminoacizilor, ARNt, diferiţi factori solubili, sistemele generatoare de energie etc.).

Starea de dependenţă totală a replicării virale de substratul celular viu corespunde relaţiei de *parazitism absolut*, esenţial distinctă de cea a *parazitismului obligat*, caracteristic unor microorganisme patogene (*Treponema, Rickettsia* etc.). Aceste bacterii preiau substanţele nutritive ale gazdei, dar îşi păstrează totdeauna integritatea structurală. Diviziunea lor are loc pornind de la ansamblul integrat al structurilor celulare. In contrast, replicarea virală necesită, în esenţă, numai genomul viral, toate celelalte componente necesare replicării fiind de origine celulară.

Celula infectată cu un virus constituie un complex viu – *complexul virus-celulă* – în care se desfăşoară două categorii de procese:

- sintezele moleculare specific virale
- diataxia virală. Termenul de "diataxie"(Lwoff, 1981) semnifică "punerea în ordine" sau asamblarea moleculelor specific virale, în structuri virale.

Replicarea virală este, în esenţă, rezultatul exprimării programului genetic viral, datorită căruia, ordinea celulară normală este înlocuită de ordinea virală. Informaţia genetică virală deviază metabolismul celulei în sensul sintezei componentelor virale.

Deşi celula poate asigura majoritatea funcţiilor replicării virale, adeseori este necesară acţiunea unor enzime virale existente în virion sau codificate timpuriu de genomul viral.

Numărul genelor virale diferă considerabil. Ele codifică sinteza următoarelor categorii de proteine:

- enzime pentru *replicarea genomului* viral (replicaze). Ele pot fi componente ale virionului matur (infecţios) sau se sintetizează în celulă, după infecţie;
- proteine *structurale*, componente ale capsidei şi peplosului;
- proteine *reglatoare*, de două categorii: a)cele care orientează biosinteza macromoleculelor celulei în sensul specificităţii virale; b)proteine reglatoare ale morfogenezei virale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Multiplicarea virală (producerea particulelor virale progene) este condiţionată de infecţia fiecărei celule, *in vivo* sau *in vitro*, cu cel puţin o particulă virală. Practic însă, pentru a asigura infecţia fiecărei celule a unei culturi şi un grad foarte înalt de sincronizare a etapelor replicării sunt necesare 10-100 particule virale pentru fiecare celulă.

Calitatea unei celule sau a unui organism de a fi gazdă pentru multiplicarea unui virus poartă denumirea de *sensibilitate.*

Pentru ca o celulă să fie sensibilă la infecţie, sunt necesare două condiţii:

- suprafaţa virionului să interacţioneze cu componentele moleculare ale suprafeţei celulei;
- celula să permită desfăşurarea ciclului de replicare (să fie permisivă).

Tipurile de celule şi speciile de organisme pe care le poate infecta şi în care se poate multiplica un virus, definesc *spectrul său de gazdă*. Unele virusuri au spectrul de gazdă foarte larg şi se pot multiplica în celulele unor specii foarte diverse. De exemplu, unele se multiplică în ţesuturile insectelor hematofage şi sunt transmise vertebratelor, la care produc infecţii. Unele rhabdovirusuri infecţioase pentru vertebrate se multiplică în ţesuturile insectelor, dar şi ale unor plante. Alte virusuri sunt foarte specializate şi infectează câteva tipuri de celule ale unei specii.

Multiplicarea virală se desfăşoară într-o serie de etape succesive, mai mult sau mai puţin secvenţiale, deşi o anumită fază trece treptat în cea următoare, astfel încât după câteva ore de la infecţie, într-o singură celulă se pot întâlni majoritatea fazelor replicării unui virus cu genom ADN.

Iniţierea procesului infecţios

Multiplicarea virală este precedată de interacţiunea virionilor cu substratul celular. Primul eveniment preliminar al replicării este *adsorbţia* particulei virale, ca o consecinţă a ciocnirilor întâmplătoare a virionilor aflaţi în suspensie, cu suprafaţa celulei. Procesul adsorbţiei nu este eficient, uneori fiind necesare milioane de ciocniri favorizate de mişcările browniene ale moleculelor din suspensie. Forţele de atracţie electrostatică au rol important în realizarea adsorbţiei. Densitatea virionilor şi a celulelor influenţează decisiv eficienţa acestui proces, care este reversibil.

Ataşarea sau fixarea ireversibilă a virusului pe suprafaţa celulei, presupune acţiunea unui mecanism care stabilizează interacţiunea, până în momentul înglobării virionului. Una din particularităţile virusurilor şi anume *specificitatea* lor pentru o anumită categorie de celule este în primul rând o specificitate de fixare, condiţionată de interacţiunea unei proteine virale(ligand sau antireceptor), de un constituient normal al suprafeţei celulare, care are rolul de *receptor de virus*. Ligandul este orice moleculă sau structură care mediază interacţiunea specifică sau nespecifică dintre un virus şi celulă sau dintre două celule. Rolul interacţiunii specifice este demonstrat de faptul că acidul nucleic viral purificat este infecţios pentru un spectru mai larg de celule.

Gradul de specificitate a interacţiunii virus-celulă este diferit. Celulele vegetale nu au receptori de virus pe suprafaţa lor şi de aceea interacţiunea virus-celulă este lipsită de specificitatea de fixare. Infecţia celulei vegetale este condiţionată de lezarea peretelui celulozic.

Interacţiunea fag-bacterie este caracterizată printr-un grad înalt de specificitate (utilizată în scop practic pentru tipizarea fagică a tulpinilor bacteriene), iar aceea dintre virus şi celula animală are un nivel intermediar. Uneori, ataşarea virusului de celula animală este mediată de receptori foarte specifici, de aici decurgând *citotropismul*, cu consecinţe majore asupra patogenităţii virale. De exemplu, poliovirusul (un enterovirus) are specificitate de legare pentru celulele mucoasei intestinale şi pentru motoneuronii din coloanele anterioare ale măduvei spinării. In mod obişnuit, ciclul se desfăşoară în celulele mucoasei intestinale, fără manifestări clinice, dar după infecţia motoneuronilor survine paralizia musculară.

Se cunosc mai bine liganzii virali, decât receptorii celulari. Virionii înveliţi se leagă de receptorii celulari prin glicoproteinele peplosului, care adesea proemină sub forma spiculelor.

Definirea receptorului celular de virus este dificilă, deoarece particula virală este un ligand de dimensiuni mari, ce interacţionează cu o suprafaţă mare a celulei, la nivelul căreia se

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

găsesc molecule de legare specifică şi nespecifică. Pe de altă parte, virusul se poate lega de receptori diferiţi pe diferite tipuri de celule. Totuşi, s-au identificat receptorii celulari pentru câteva virusuri. Astfel, ligandul virusului influenza – *hemaglutinina* (o glicoproteină a peplosului) se leagă specific de resturile de acid sialic ale glicoproteinelor membranei citoplasmatice. Virusul imunodeficienţei dobândite (HIV_1) se leagă cu specificitate înaltă, prin intermediul spiculelor din peplos, de glicoproteina CD_4 de pe suprafaţa limfocitelor Th, cele care reglează activitatea întregului sistem imunitar. Receptorul pentru C_{3d} (un derivat al lui C_{3b}) de pe suprafaţa limfocitelor B este şi receptor pentru virusul Epstein-Barr (EBV), iar receptorul pentru acetilcolină, de la nivelul sinapselor neuroefectoare poate fi receptor şi pentru virusul rabic. Receptorul celular pentru virusul herpes simpex 1 (HSV_1) este heparan-sulfatul.

Structurile de legare a virusurilor nude cu simetrie icozaedrică sunt situate la vârfurile icozaedrului. Ele sunt polipeptide ale capsidei sau sunt proteine fibrilare proeminente la vârfuri (de exemplu, fibra pentonică a adenovirusurilor). Receptorii celulari pentru această categorie de virusuri sunt practic necunoscuţi.

Din punct de vedere biochimic, receptorii celulari pentru virusuri sunt *glicoproteine, glicolipide* sau *glucide*. Specificitatea de legare este conferită de o parte a unei macromolecule sau de catenele glucidice ale conjugatelor glicoproteice.

Pentru ca o moleculă membranară să aibă rolul de receptor pentru virus, în primul rând, trebuie să aibă o densitate suficient de mare pentru a asigura interacţiuni multiple cu ligandul viral.

Celulele organismelor uman şi animal au receptori pentru un număr mare de agenţi infecţioşi. Teleonomic însă, moleculele cu rol de receptori nu sunt destinate legării virionilor, ci îndeplinesc diferite funcţii normale: de exemplu, unele au rol de receptori de hormoni. Moleculele care au rol de receptori de virus sunt polifuncţionale. Virusurile împrumută diferite molecule ale suprafeţei celulare, prin intermediul cărora dobândesc accesul în celulă. Numărul receptorilor de virus, pe suprafaţa unei celule este cuprins între 10 000 şi 100 000.

De cele mai multe ori, ataşarea virusului determină modificări reversibile în structura receptorului şi în mod obligatoriu urmează internalizarea (înglobarea virusului în celulă). Uneori însă, după fixare, virionul se poate detaşa şi se reabsoarbe pe altă celulă. Detaşarea virionilor ortho- şi paramixovirusurilor se datorează faptului că spiculii de neuraminidază (NA) inclavaţi în peplos, clivează acidul sialic (neuraminic) al glicoproteinelor celulare cu rol de receptor şi astfel virionul se desprinde (fenomen denumit eluţie). De aceea, se admite că rolul NA este de a desializa glicoprotenele pe măsură ce ele sunt inserate în învelişul viral nascent. Astfel, hemaglutininele (HA) nu mai au şansa legării de acidul sialic al învelişului altor virioni, prevenind aglutinarea şi inactivarea lor. Clivarea acidului sialic sub acţiunea NA are un rol important în eliberarea virionilor progeni. Anticorpii anti-NA diminuă semnificativ rata eliberării virionilor din celulele infectate.

Glicoproteina CD_4, după interacţiunea cu HIV se modifică prin fosforilare, o modificare esenţială pentru înglobarea virionului infectant. Inhibiţia fosforilării cu inhibitori ai protein-kinazei blochează înglobarea şi virionii rămân la suprafaţa celulei.

Chiar dacă virusul nu pătrunde în celulă, legarea sa de membrana citoplasmatică influenţează activitatea celulei. De exemplu, legarea VEB de suprafaţa limfocitului B poate iniţia activarea acestuia. In acest caz, virusul are rol de ligand, declanşator al activării celulare.

Pătrunderea virusului în celulă(infecţia propriu-zisă)

Faza de pătrundere sau de înglobare a virusurilor în celulele sensibile se desfăşoară după mecanisme diferite, derivate din complexitatea structurilor de suprafaţă ale celulei şi ale virionului.

Peretele mureinic al bacteriilor Gram pozitive, complexitatea structurală a peretelui bacteriilor Gram negative, precum şi natura celulozică a peretelui vegetal constituie bariere foarte eficiente faţă de infecţia virală. Celulele vegetale sunt infectate numai după leziunea mecanică a peretelui celulozic, iar fagii din seria T-par au un aparat complex, foarte specializat, prin intermediul căruia genomul viral este injectat în celula bacteriană.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virusurile infecţioase pentru celulele animale sunt înglobate în întregime în celula sensibilă, consecinţa directă a absenţei peretelui celular.

Pătrunderea virusurilor în celula animală, după fixarea ireversibilă se poate produce prin două mecanisme fundamentale: *endocitoza şi fuziunea*.

Mecanismul predominant prin care virusurile pătrund în celula animală este *endocitoza* (denumită şi *viropexie*), un proces analog celui de pinocitoză, caracteristic virusurilor nude (adeno-, reovirusuri), dar şi unor virusuri învelite (influenza).

Interacţiunea iniţială a virionului cu receptorii din membrana celulară nu este suficientă pentru a declanşa endocitoza particulei legate, ci reprezintă semnalul pentru iniţierea agregării proteinelor contractile ale celulei şi pentru formarea unor pseudopode. Acestea uşurează interacţiunile multiple ale suprafeţei virionului cu receptorii celulei. Prin activarea proteinelor contractile ale citoplasmei se realizează închiderea particulei virale, într-o vacuolă de endocitoză, denumită *microveziculă* sau *pinosom*, printr-un mecanism similar închiderii unui fermoar. Marginile libere ale membranei celulare invaginate, fuzionează şi restabilesc integritatea suprafeţei celulare, astfel încât virusul rămâne inclus într-o veziculă de endocitoză. Vezicula pierde învelişul de clatrină şi fuzionează cu mici cisterne de reticul endoplasmic neted şi cu lizosomi. Se formează un *endosom* al cărui pH se acidifică sub acţiunea unei pompe protonice din membrană. Pe măsură ce pH scade, proteinele capsidei suferă modificări de conformaţie şi expun un domeniu hidrofob ce determină fuziunea cu membrana endosomului. Acesta este mecanismul de pătrundere a virionilor nuzi, prin *liza endosomului*.

Pentru virusurile învelite, la pH acid al endosomului, învelişul viral fuzionează cu membrana endosomului, ceea ce favorizează eliberarea nucleocapsidei în citoplasmă.

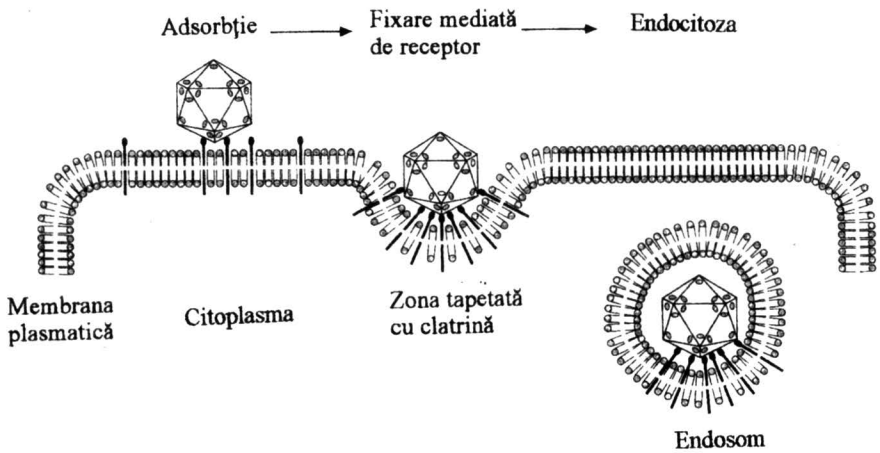


Fig. 113. Înglobarea unei particule virale nude prin mecanismul endocitozei mediată de receptori.

Mecanismul înglobării prin endocitoză este întâlnit la toate virusurile nude, precum şi la influenza, rhabdo- şi poxvirusuri, dintre cele învelite.

Al II-lea mecanism de pătrundere, pentru unele virusuri învelite, constă într-un proces de *fuziune* a suprafeţei învelişului viral cu membrana citoplasmatică. Peplosul viral, la contactul cu membrana celulară, se dizolvă şi rămâne încorporat în membrana plasmatică. La locul coalescenţei celor două structuri, se formează un "canal", care permite trecerea virionului în citoplasmă.

Fuziunea învelişului viral, cu membrana plasmatică, necesită interacţiunea proteinelor virale "de fuziune" ale peplosului, cu constituienţii specifici ai membranei celulare. Fuziunea este modalitatea de pătrundere în celulă, caracteristică virusurilor cu înveliş extern. Dinamica mecanismului său este inversă celei ce are loc în timpul înmuguririi. Astfel pătrund în celulă unele paramixo- şi poxvirusuri.

Paramixovirusurile conţin, inclavată în peplos, *o proteină de fuziune (F)*, care mediază fuziunea învelişului viral cu membrana celulei sensibile. Proteina F mediază fuziunea celor două structuri, numai dacă este inclavată în învelişul fosfolipidic viral şi dacă este ţinută în contact strâns cu membrana celulară, prin intermediul hemaglutininelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

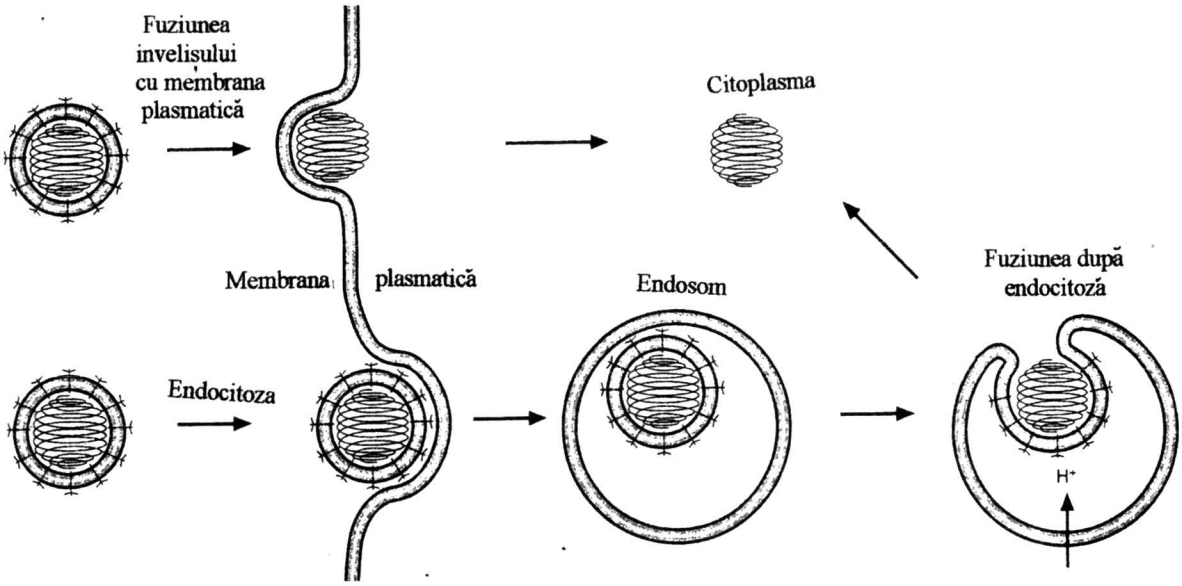


Fig. 114. Virusurile învelite pătrund în celulă pe două căi: învelișul lor fuzionează cu membrana plasmatică imediat după interacțiunea cu receptorii sau învelișul fuzionează după endocitoză, cu membrana endosomului.

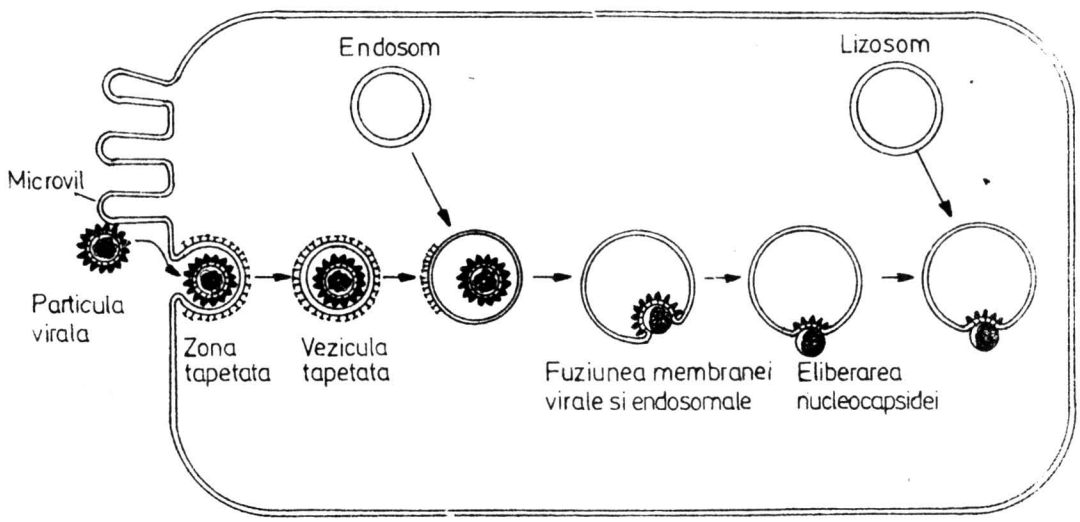


Fig. 115. Unele virusuri animale învelite intră în celulă, fiind endocitate în vezicule tapetate cu clatrină. Vezicula de fagocitoză își pierde învelișul de clatrină și fuzionează cu lizosomii. Scăderea pH în veziculă determină un proces de fuziune a învelișului viral cu membrana veziculei endosomale și eliberarea nucleocapsidei în citoplasmă.

Cele două mecanisme de înglobare (endocitoza şi fuziunea) nu se exclud reciproc. Acelaşi virus învelit poate fi înglobat pe o cale sau altă, în funcţie de substratul celular. Mai mult, cele două mecanisme pot coexista frecvent pentru un virus dat, în raporturile sale cu o linie celulară.

Rareori, virionul pătrunde în celulă prin modalităţi particulare:

- apariţia unor breşe în membrana plasmatică sau dizolvarea ei la contactul cu virionul. Se produce liza, atât a învelişului viral, cât şi a membranei celulare;
- trecerea directă a virionilor intacţi, ca şi cum ar dizolva membrana plasmatică, deschizând calea spre interiorul celulei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Decapsidarea este procesul de conversie treptată a virusului, din starea de virion complet, la starea de *virus vegetativ* (genom liber în celula infectată), prin pierderea capsidei şi, când este cazul, a învelişului viral.

Dezvelirea este un proces puţin cunoscut, datorită dificultăţilor de modelare experimentală şi se produce în trepte. La reovirusuri, dezvelirea se iniţiază înainte de contactul cu celula gazdă, sub acţiunea proteazelor intestinale. La picornavirusuri, capsida se dezagregă parţial la suprafaţa celulei, după legarea de receptorul celular. Cel mai adesea, dezvelirea are loc în vezicula endosomală, sub acţiunea proteinelor lizosomale şi a pH acid.

Adenovirusurile şi virusurile herpetice se dezvelesc la contactul cu porul nuclear.

Genomul virusurilor din grupul pox este eliberat în două etape: învelişul extern este degradat sub acţiunea enzimelor citoplasmatice, iar eliberarea ADN din regiunea centrală necesită participarea produselor de sinteză a unor gene virale timpurii.

In vitro, dezvelirea virusurilor cu peplos este modelată sub acţiunea detergenţilor neionici. Aceştia interacţionează cu componentele hidrofobe ale membranei şi astfel peplosul este rupt şi solubilizat.

Deplasarea intracelulară a virusurilor până la locul replicării este necesară numai pentru cele care au sedii caracteristice ale replicării. Cele care se replică în *citoplasmă* ajung uşor la sediul desfăşurării procesului, imediat după ce au străbătut membrana citoplasmatică.

Virusurile al căror sediu de replicare este *nucleul*, necesită transferul de la locul pătrunderii în celulă, până în nucleu. Pentru cele mai multe virusuri, mecanismul celular al transportului nu este cunoscut, dar în mod cert există o varietate de modalităţi ale procesului. Virusurile intră în nucleul celulei, fie ca particule subvirale (ribonucleoproteine).

Proteinele virale asociate cu acidul nucleic au, se pare, rol esenţial în procesul de transport. Nu se cunoaşte nici un acid nucleic viral transportat în nucleu ca moleculă liberă. Proteinele asociate acidului nucleic viral, îndeplinesc două funcţii:

- furnizează semnale specifice şi orientează transportul complexului spre nucleul celulei;
- conferă complexului o configuraţie stabilă, compatibilă cu transferul prin porii membranei nucleare.

Acizii nucleici monocatenari sunt transportaţi cu o eficienţă mai mare deoarece moleculele monocatenare sunt polare, mai flexibile şi sunt tapetate cu proteina SSB (*s*ingle *s*trand *b*inding). De exemplu, ARN viral influenza este transportat în nucleu sub forma ribonucleoproteinei. Proteinele complexului mediază transferul nuclear.

Dezoxiribovirusurile învelite (cele herpetice, precum şi virusurile învelite ale insectelor) pătrund în nucleu ca particule nucleoproteice, ca şi oncornavirusurile.

Pentru virusurile nude, care pătrund în nucleu ca virioni întregi, deplasarea pare a fi "orientată" de un tropism neexplicat. Nu se cunoaşte mecanismul prin care virionul penetrează membranele nucleare. Transportul virusului în nucleu s-ar realiza prin fuziunea nucleocapidei cu membrana nucleară, prin pinocitoză sau prin pătrundere directă. La virusurile din grupul *Papova*, pătrunderea în nucleu se face prin fuziunea nespecifică a veziculei de endocitoză, cu membrana nucleară externă, după care, virusul intact sau numai genomul trece în nucleoplasmă, prin fuziunea vacuolei cu membrana internă.

Modelul propus, bazat pe imagini electrono-optice nu explică trecerea virionului prin membrana nucleară internă şi nici specificitatea şi eficienţa înaltă a tranzitului viral spre nucleu, având în vedere că virionii de SV_{40} se găsesc în nucleu la 15 min. după infecţie. Faptul trebuie explicat prin cariofilia virionilor de SV_{40}.

Adenovirusurile sunt transportate prin citoplasmă, într-o vacuolă de origine membranară, până la contactul cu un por nuclear, prin care acidul nucleic este transferat în nucleu, iar capsida rămâne la nivelul anvelopei nucleare.

Biosinteza proteinelor timpurii

Proteinele virale sunt sintetizate de aparatul celular de sinteză proteică (aminoacizi, ARNt, ribosomi, enzimele catalizatoare). Sinteza proteinelor cu specificitate virală este evenimentul esenţial al ciclului de replicare virală şi necesită existenţa unui mesaj generat în etapa transcrierii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transcrierea este prima treaptă a expresiei genelor virale şi urmează pătrunderii nucleocapsidei în celulă. Activitatea transcriptazelor asociate virionului, începe foarte curând după dezagregarea parţială a capsidei şi se sintetizează ARNm.

Sinteza proteinelor virale timpurii semnifică traducerea unui mesaj străin celulei şi este supusă unor restricţii.

Prima restricţie derivă din faptul că virusul trebuie să ofere aparatului de sinteză a celulei, un ARNm pe care celula trebuie să-l recunoască şi să-l traducă în proteine. În citoplasmă lipsesc enzimele necesare sintezei ARNm viral, astfel că transcrierea genomului viral ADN sau ARN nu are loc. Datorită acestui fapt, virusurile cu genom ADN care nu au propriile enzime de transcriere (adeno, herpes) pot fi transcrise în ARNm numai după ce ajung în nucleu. Poxvirusurile sunt o excepţie. Ele au propria enzimă de transcriere (ARN-polimeraza) pentru sinteza ARNm şi se replică în citoplasmă.

Genomul viral ARN este transcris în ARNm de o enzimă proprie de transcriere, ori ARN genomic funcţionează şi ca ARNm şi sediul replicării lor este citoplasma.

A II-a restricţie a sintezei proteinelor virale derivă din aceea că aparatul de sinteză proteică a celulei traduce numai mesaje unitare monocistronice şi nu recunoaşte situsurile multiple de iniţiere a traducerii unui ARNm viral policistronic. Consecinţa este că, la unele virusuri, informaţia genetică este transcrisă în câteva tipuri de ARNm monocistronic şi fiecare din ele codifică o proteină (sau două în cazuri rare), iar la altele se sintetizează un ARNm policistronic, copie a câtorva gene, care este tradus într-o *poliproteină* gigantă, clivată ulterior în proteine individuale de mărime adecvată. Poliproteina nu se evidenţiază la electroforeză în gel de poliacril-amidă, deoarece este clivată chiar în timp ce se sintetizează. Inhibiţia clivajului, prin încorporarea analogilor aminoacizilor sau prin creşterea temperaturii face posibilă detectarea ei la electroforeză.

A III-a restricţie a sintezei proteinelor virale este consecinţa faptului că în celula infectată, exprimarea genelor virale este în competiţie cu activitatea numeroaselor gene celulare.

Pentru sinteza unor cantităţi adecvate de proteine virale s-au evidenţiat două strategii:

- conferirea unui avantaj competitiv al traducrii ARNm viral;
- inhibiţia sintezei şi traducerii ARNm celular.

Sinteza ARNm viral

Existenţa mesagerilor cu specificitate virală este o condiţie esenţială pentru iniţierea procesului de replicare virală. Generarea mesagerilor virali semnifică începutul subordonării aparatului de sinteză proteică şi trecerea de la sinteza proteinelor celulare, la sinteza celor specific virale.

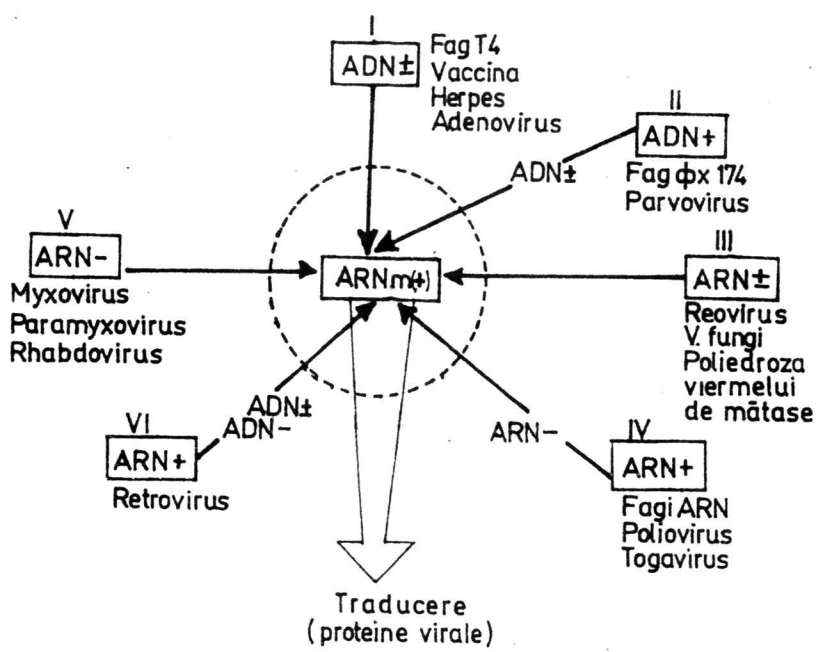


Fig. 116. Clasificarea sistemelor genetice virale în funcţie de complementaritatea lor faţă de ARNm.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La virusurile care nu posedă o polimerază proprie, sinteza ARNm este catalizată de două categorii de polimeraze: a) *ARN-polimeraza II celulară*, pentru virusurile a căror informaţie genetică este transcrisă în nucleu (la dezoxiribovirusuri); b) *ARN-polimeraza virionică*, la cele care se replică în citoplasmă (poxvirusuri şi ribovirusri). Analiza secvenţei ARN-polimerazei II a celulei şi a ARN-polimerazei virale a evidenţiat existenţa unor omologii ale secvenţei aminoacizilor, inclusiv ale secvenţei Gly-Asp-Asp. Acest tripeptid se găseşte chiar şi în ARN-polimeraza fagică şi în reverstranscriptază. De aceea se consideră că are rol în recunoaşterea matriţei de acid nucleic.

Cele mai multe molecule de ARNm viral sunt *monocistronice.*

Sinteza ARNm la dezoxiribovirusuri

In funcţie de structura moleculară a materialului genetic, virusurile cu genom ADN se împart în trei clase:

- virusuri cu genom dublu catenar, linear (adeno-, herpesvirusuri etc.);
- virusuri cu genom dublu catenar, circular (papovavirusuri);
- virusuri cu genom monocatenar, linear (parvovirusuri).

Toate genomurile ADN lineare, mono- sau dublu catenare au secvenţe repetate invers, fie la extremităţi (adeno-), fie atât la extremităţi, cât şi în interior.

Sinteza ARNm este rezultatul transcrierii unicei catene, la cele cu genom monocatenar, sau a uneia dintre catene, la cele cu genom dublu catenar.

Transcrierea este catalizată de *ARN-polimeraza II celulară*, la cele care au sediul nuclear al replicării (adeno, herpes) sau de *ARN-polimeraza proprie* (pentru cele care sunt replicate în citoplasmă – poxvirusuri).

La majoritatea virusurilor cu genom ADN, se disting două faze ale transcrierii: *timpurie şi tardivă.*

O mică parte a genomului, este transcrisă în *ARNm timpuriu, necesar sintezei proteinelor precoce.* Cea mai mare parte a genomului este transcrisă ulterior, în *ARNm tardiv.* Cele două etape ale transcrierii sunt separate în timp, de momentul replicării genomului viral

Dezoxiribovirusurile, infecţioase pentru celulele eucariote, au *informaţie genetică discontinuă*, formată din secvenţe codificatoare (exoni), ce alternează cu secvenţe necodificatoare (introni). Ca o consecinţă a acestui fapt, transcrierea genelor se face, iniţial, într-o moleculă de *ARN premesager*, ce va fi prelucrat ulterior. Se elimină secvenţele necodificatoare (intronii) după procesul clivării, iar exonii se reunesc prin procesul de înădire (splicing). Copiile de ARNm viral sunt supuse şi altor modificări: adăugarea secvenţei de poli-A (100-200 de resturi) la capătul 3' şi metilarea capătului 5'(bonetare). Bonetarea este esenţială pentru stabilirea interacţiunii ARNm viral cu subunitatea ribosomală 40 S.

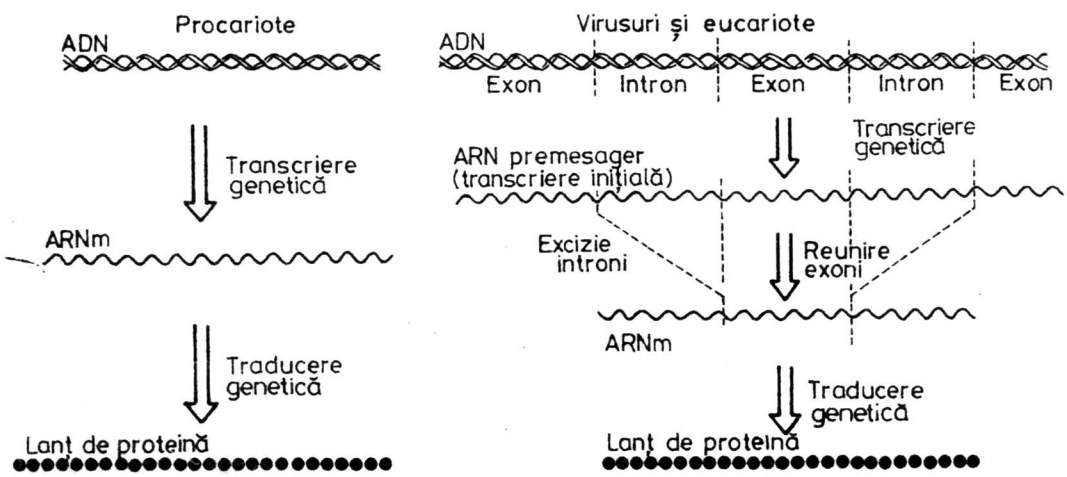


Fig. 117. Diferenţe cu privire la caracterul informaţiei genetice în procariote, faţă de virusuri şi gazdele lor eucariote. La bacterii, informaţia genică este transcrisă în ARNm şi tradusă într-o proteină. La virusuri şi gazdele lor eucariote, unele gene structurale sunt „discontinui": secvenţele codificatoare (exoni) sunt separate prin secvenţe necodificatoare (introni). Întreaga secvenţă a genei „discontinui" este transcrisă unitar într-o moleculă de ARN premesager, după care secvenţele de transcriere ale intronilor sunt excizate, iar cele ale exonilor sunt reunite („înădite") pentru a forma ARN matur, care este tradus în proteine.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transcrierea genelor timpurii este catalizată de ARN-polimeraza II celulară, aceiaşi care catalizează transcrierea ARNm celular. Prelucrarea ARNm al dezoxiribovirusurilor este de asemenea rezultatul activităţii enzimelor celulare. Atât transcrierea cât şi prelucrarea ARNm au loc în nucleu. La poxvirusuri, transcrierea ARNm este catalizată de o ARN-polimeraza proprie virionului şi procesul are loc în citoplasmă.

ARNm al dezoxiribovirusurilor este monocistronic (conţine informaţia genetică pentru sinteza unei singure proteine).

La dezoxiribovirusuri, transcrierea şi traducerea informaţiei genetice sunt evenimente *separate spaţial şi temporal*: transcrierea are loc în nucleu, iar sediul traducerii este citoplasma. Fac excepţie poxvirusurile, la care transcrierea ARNm şi traducerea au loc în citoplasmă.

Proteinele virale se sintetizează pe polisomii citoplasmatici. Pentru virusurile care se replică în nucleu, proteinele sintetizate în citoplasmă trebuie să fie transportate în nucleu, pentru a-şi îndeplini funcţia de proteine-enzime de replicare a genomului sau pentru a fi asamblate în structura virionilor.

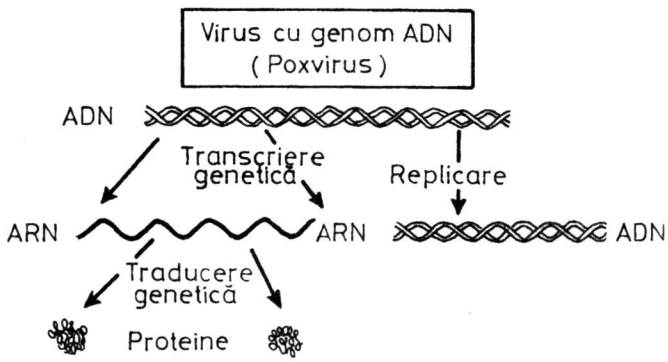


Fig. 118. Succesiunea etapelor de replicare, transcriere şi traducere a informaţiei genetice la dezoxiribovirusuri.

Proteinele virale precoce aparţin următoarelor categorii:

1) *Proteine de reglare*, cu rol de instituire şi menţinere a ordinii virale. Ele inhibă sinteza macromoleculelor specifice celulei, prin modificarea specificităţii sistemelor enzimatice de replicare, transcriere şi traducere, astfel încât sintezele macromoleculare ale celulei sunt stopate şi metabolismul este deviat de la sinteza constituienţilor proprii, la sinteza celor virali;

2) *Proteine matriceale*, cu rolul de a delimita viitoarea "fabrică de virus", adică teritoriul celular în care se replică virusul;

3) *Proteine-enzime* de tipul polimerazelor (replicaze): ADN-polimeraza, ARN-polimeraza, precum şi nucleaze (enzime de clivare), ligaze.

Cele mai multe virusuri, în faza timpurie exprimă o cantitate foarte limitată de informaţie genetică. Numai poxvirusurile exprimă 30-50 de funcţii în faza precoce.

Sinteza ARNm la ribovirusuri

La ribovirusuri, ARNm are origini diferite în funcţie de tipul de virus, de natura genomului sau (ARN mono- sau dublu catenar), dar în special în funcţie de *polaritatea* materialului genetic.

Polaritatea acizilor nucleici este stabilită convenţional, în raport cu posibilitatea traducerii lor directe sau indirecte, în proteine. ARN genomic, tradus direct în proteine, fără să necesite o etapă prealabilă de transcriere este considerat a avea *polaritate (complementaritate) pozitivă*. ARN genomic, care este mai întâi transcris într-o moleculă de ARNm complementar are *polaritate negativă*.

In ciclul de replicare a ribovirusurilor nu se face distincţia funcţională între ARNm timpuriu şi tardiv, deoarece genomul viral funcţionează alternativ ca matriţă pentru sinteza ARNm şi a ARN genomic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

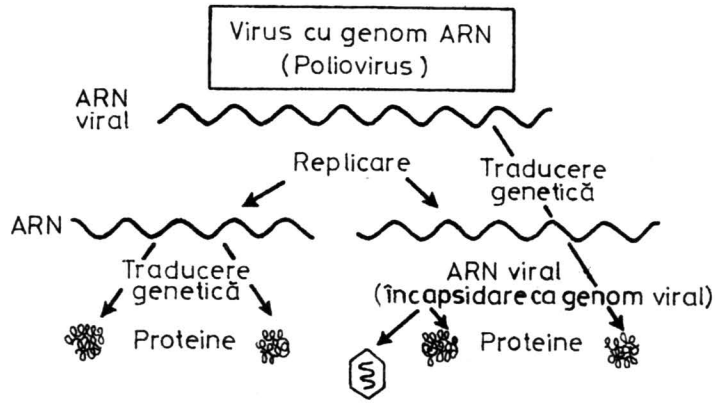


Fig. 119. Transcrierea şi traducerea informaţiei genetice la ribovirusurile cu genom de polaritate pozitivă. Genomul este tradus direct, fără transcriere, în proteine.

Traducerea ARNm al ribovirusurilor este condiţionată de faptul că celula nu recunoaşte situsurile multiple de iniţiere a sintezei polipeptidelor codificate de un mesager viral policistronic. Această deficienţă este surmontată de trei modalităţi de funcţionare a ARNm:

- la unele virusuri, ARN genomic îndeplineşte funcţia de mesager şi este tradus ca un mesaj unitar, într-o moleculă peptidică gigantă, care ulterior este clivată şi rezultă proteine virale funcţionale;
- la virusurile cu genom de polaritate negativă, transcrierea ARN genomic este iniţiată la situsuri multiple şi astfel se sintetizează mesageri monocistronici;
- rareori, genomul este fragmentat şi fiecare fragment este transcris într-un ARNm monocistronic.

După natura ARN genomic şi după raportul său cu ARNm, ribovirusurile infecţioase pentru celulele animale, pot fi împărţite în 6 clase:

- clasa I cuprinde familiile *Picornaviridae* şi *Togaviridae*, la care ARN genomic are rol de ARNm şi codifică sinteza proteinelor virale structurale şi funcţionale. Genomul acestor virusuri este infecţios, pentru că funcţionează direct ca ARNm pentru sinteza întregului set de proteine virale, inclusiv a ARN-polimerazei, care catalizează replicarea genomului viral.

Coronavirusurile au particularitatea că genomul lor, cu polaritate pozitivă, este transcris iniţial de ARN-polimeraza virală, într-o copie de sens negativ, de aceiaşi lungime. Catena negativă, la rândul ei, este transcrisă în ARNm monocistronic, de diferite lungimi;

- Virusurile clasei a II-a (*Paramyxoviridae*) au genomul cu polaritate opusă faţă de ARNm. Genomul lor de sens negativ sau antimesager nu este infecţios, deoarece nu funcţionează ca ARNm şi nu este replicat de celulă (în citoplasma celulelor animale nu s-a detectat activitate ARN-polimerazică celulară). Celulele nu conţin enzime care să transcrie matriţa de ARN. Virionul conţine o transcriptază proprie (ARN-polimeraza dependentă de ARN) care transcrie genomul de sens negativ, în ARNm monocistronic. Transcrierea este iniţiată la un singur promotor, dar la sfârşitul fiecărei gene, copia este eliberată. Promotorii sunt secvenţe de ADN care reglează expresia regiunilor codificatoare adiacente;

- Virusurile clasei a III-a (*Myxoviridae*) au genom segmentat, monocatenar, cu polaritate negativă. Fiecare segment genomic este transcris în propriul său mesager. Fiind de polaritate negativă, transcrierea catenei genomice în ARNm este catalizată de o ARN-polimerază dependentă de ARN, existentă în virion, analogă funcţional cu enzima de transcriere a altor ribovirusuri cu catena genomică ARN de polaritate negativă. ARN-polimeraza virusului influenza este defectivă din punct de vedere funcţional: nu iniţiază sinteza ARNm şi nici nu-l modifică prin bonetare sau metilare internă. Aceste funcţii sunt suplinite de ARN-polimeraza II a celulei, cea care catalizează iniţierea sintezei şi metilarea ARNm celular;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- clasa a IV-a (*Arenaviridae*) au genom ARN monocatenar, format din două fragmente. Particularitatea sa funcţională constă în aceea că jumătatea 3' a fiecărui fragment genomic are o polaritate negativă şi este transcrisă în ARNm complementar, de o transcriptază virionică, iar jumătatea 5' a fiecărui fragment are polaritate pozitivă. Pentru jumătatea 5', ARNm rezultă după o transcriere dublă: mai întâi se sintetizează o copie a genomului şi ulterior, aceasta este transcrisă în ARNm. Deoarece informaţia este înscrisă în direcţii opuse în cele două jumătăţi ale fiecarui fragment, strategia de codificare a genomului este *ambisens*.

La *Bunyaviridae*, genomul este de asemenea ambisens, deoarece atât ARN genomic (de sens negativ), cât şi catena complementară transcrisă ulterior (de sens poztiv), funcţionează ca ARNm;

- clasa V-a (*Reoviridae*) au genomul ARN dublu catenar, segmentat. Fiecare din cele 10 segmente genomice este transcris separat la ARNm, de o transcriptază a virionului. Transcrierea este conservativă, deoarece catenele genomice parentale nu se separă şi numai catena de complementaritate negativă funcţionează ca matriţă. ARNm este monocistronic. ARN genomic rămâne în regiunea centrală a virionului, iar copiile complementare sunt eliminate prin capsida parţial dezintegrată.

- clasa VI-a (*Retraviridae*) prezintă particularitatea că genomul lor se replică printr-o copie intermediară de ADN. ARN genomic nu funcţionează ca ARNm, deşi are complementaritate pozitivă, dar nu este infecţios pentru că replicarea sa este dependentă de *revers-transcriptaza* asociată virionului. Revers-transcriptaza transcrie ARN genomic într-o moleculă de ADN.

Replicarea genomului viral

In etapa timpurie se sintetizează proteine virale cu rol enzimatic, care condiţionează procesul replicării virale şi implicit, evoluţia complexului virus-celulă gazdă.

Replicarea genomului ADN

Pentru replicarea ADN viral sunt utilizaţi precursorii din mediul de creştere a celulelor, deoarece ADN celular nu este degradat. Procesul replicării genomului viral a fost studiat prin tehnica autoradiografiei, ce constă în adăugarea în mediul nutritiv, a precursorilor nucleotidelor, marcaţi radioactiv şi detectarea lor ulterioară în ADN viral. Replicarea genomului viral ADN este dependentă de acţiunea catalitică a unei ADN-polimeraze.

Virusurile mici utilizează ADN-polimeraza celulară, iar cele complexe (adeno, herpes), codifică sinteza ADN-polimerazelor proprii. Virusurile herpetice codifică 7 proteine-enzime, cu rol în replicarea genomului.

Replicarea ADN viral se face după modelul semiconservativ. Mecanismul replicării s-a studiat la toate familiile de dezoxiribovirusuri.

La *adenovirusuri*, genomul este o moleculă dublu catenară, lineară, de 2000-2500 kD (circa 36 kbp), cu secvenţe repetate invers, lungi de 100-140 nucleotide, la ambele extremităţi ale celor două catene. Ele permit circularizarea moleculelor monocatenare care apar în timpul replicării. La cele două capete 5', catenele genomice sunt asociate covalent cu o proteină de 55 kD.

Replicarea ADN al adenovirusurilor, catalizată de ADN-polimeraza proprie este semiconservativă şi asimetrică. Asimetria constă în faptul că numai una din catene este copiată într-o catenă complementară.

Replicarea se iniţiază la capătul 5' al uneia din cele două catene ale moleculei genomice parentale. ADN-polimeraza nu iniţiază sinteza *de novo* a unei catene de ADN, având nevoie totdeauna de un *primer*[*], care de obicei este un fragment de ARN complementar faţă de una din catene. Ulterior, secvenţa de ARN este înlocuită cu una de ADN. La adenovirusuri, rolul de primer revine proteinei de 55 kD, legată covalent la capătul 5'. Catena 5' se alungeşte în direcţia 5' - 3' a catenei matriţă şi nu necesită fragmente Okazaki. Catena nascentă deplasează catena preexistentă de aceiaşi polaritate şi împreună cu catena matriţă de polaritate opusă, formează o moleculă dublu catenară.

[*] ADN polimeraza nu iniţiază sinteza *de novo a unei* catene de ADN, ci alungeşte o catenă preexistentă. Acţiunea ei catalitică necesită existenţa unei scurte catene polinucleotidice, care are rolul *de primare* a reacţiei de polimerizare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

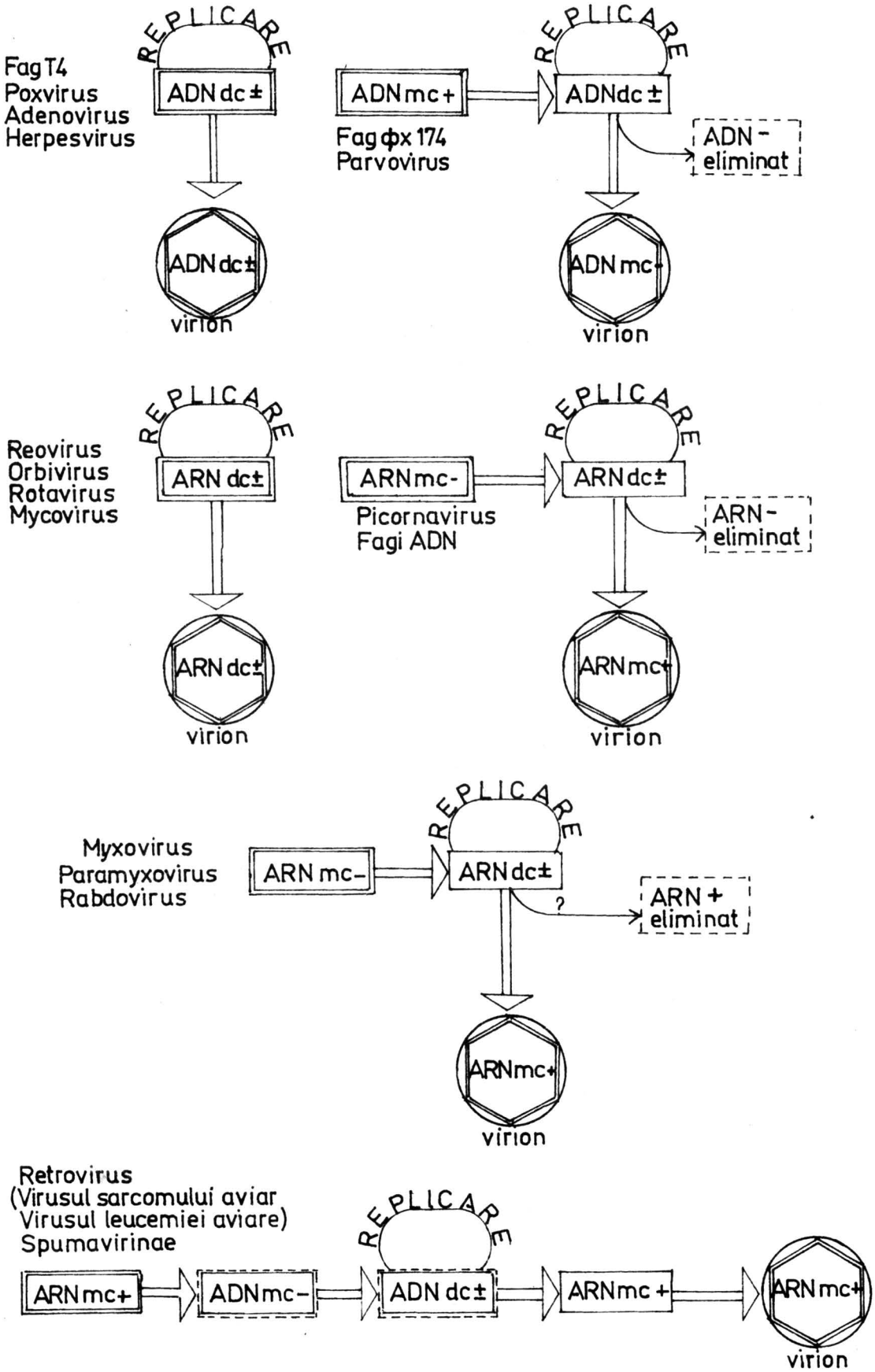


Fig. 120. Scheme de replicare a genomurilor virale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

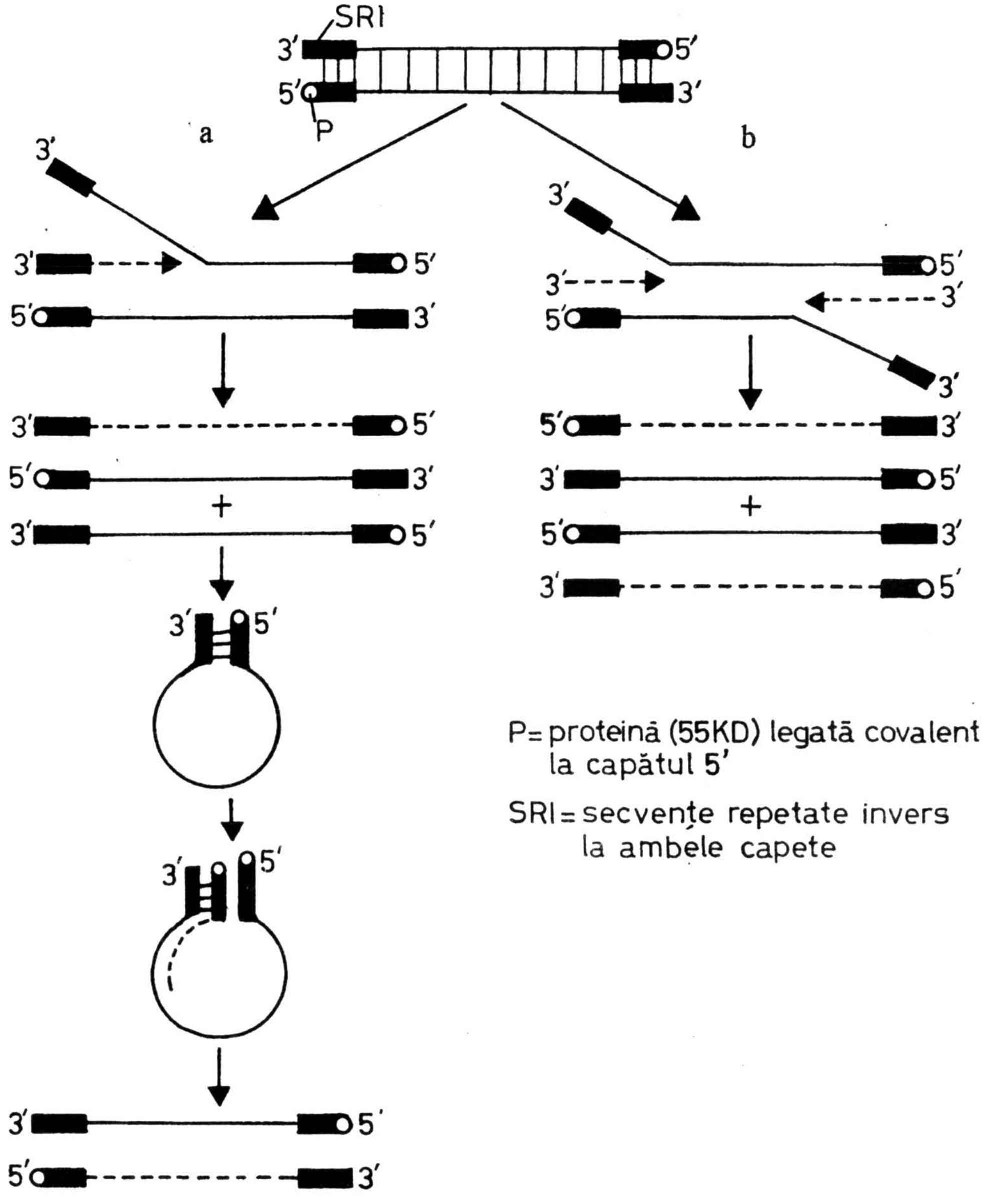


Fig. 121. Modelul replicării genomului adenovirusurilor. Replicarea începe la un singur capăt al moleculei dublu catenare lineare (a) sau la ambele capete (b). Catena nascentă (linia punctată) deplasează catena parentală de același sens. Catena deplasată se circularizează și se replică, rezultând o moleculă dublu catenară lineară (după Davis, 1990).

Catena deplasată se circularizează şi are rol de matriţă pentru sinteza unei catene complementare. Cinetica apariţiei radioactivităţii în catenele nou sintetizate, a evidenţiat un gradient ce scade în direcţia 3'- 5'.

Virusurile din grupul *Papova* au genomul format dintr-o moleculă de ADN dublu catenară, circulară. Replicarea moleculei circulare se realizează după modelul semiconservativ, bidirecţional şi simetric. După acelaşi mecanism are loc replicarea ADN la procariote, precum şi a ADN din organite (mitocondrii, cloroplaste).

Replicarea este precedată de despiralizarea celor două catene, iniţial, ca rezultat al inciziei uneia dintre ele. Ulterior este incizată şi cea de a II-a catenă. Inciziile sunt reparate rapid după ce s-a produs despiralizarea.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Enzimele care incizează şi repară rapid breşele moleculei de ADN se numesc *topoizomeraze*. Rolul topoizomerazelor este acela de a relaxa ADN superhelical, în sens pozitiv sau negativ, în absenţa unui cofactor energetic. Topoizomerazele produc modificări ale configuraţiei spaţiale (topologice) a moleculei de ADN, prin modificarea gradului de spiralizare.

Virusurile *Papova* nu au topoizomeraze proprii, ci utilizează enzimele celulare.

Replicarea moleculei circulare începe la un punct fix, denumit *originea replicării*, iar punctul în care catenele moleculei parentale se separă şi sunt sintetizate catenele noi, se numeşte *bifurcaţie de replicare*.

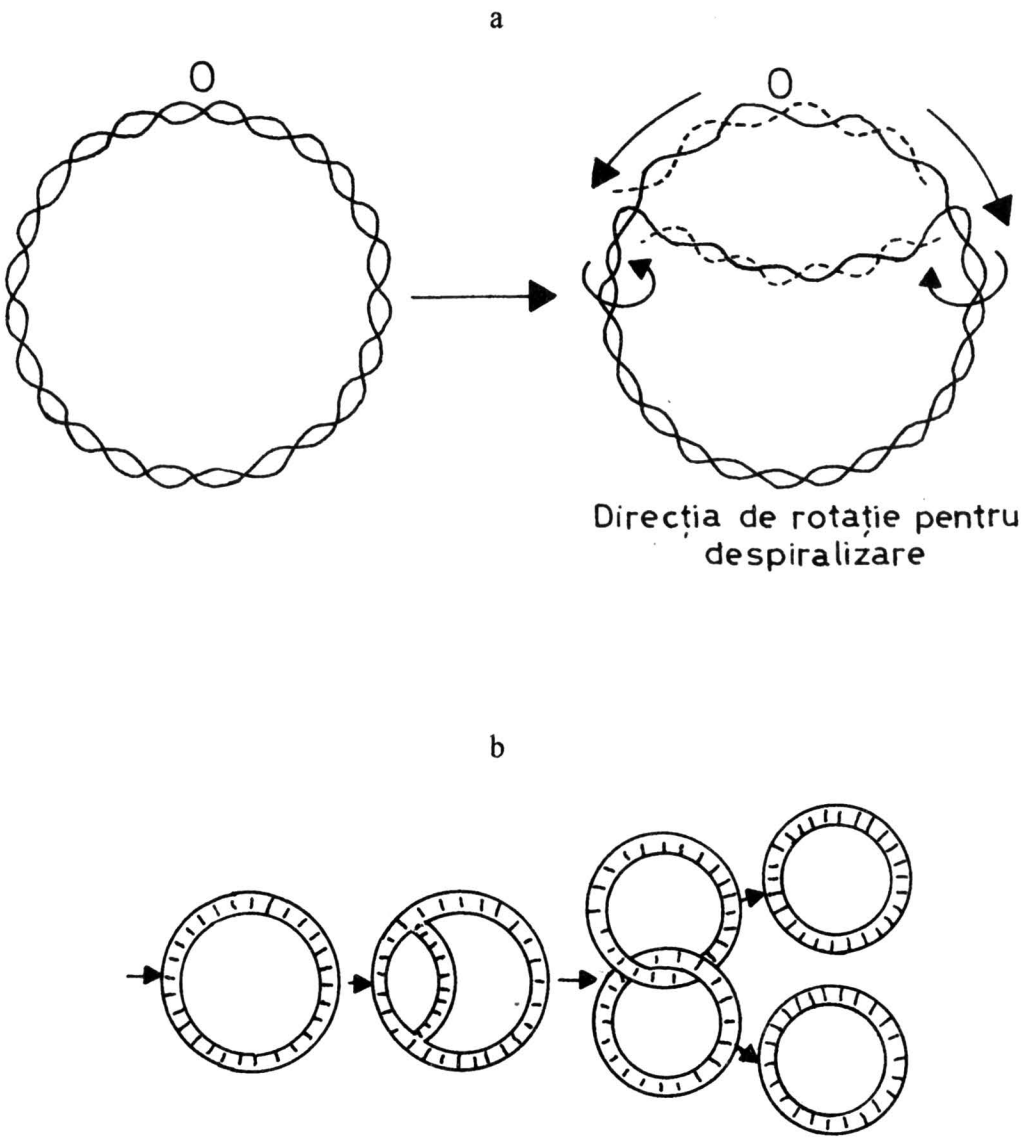


Fig. 122. Replicarea genomului ADN dublu catenar circular, după modelul cercului simplu. a. Replicarea începe la secvenţa de origine (0) şi continuă în ambele direcţii. Cele două bifurcaţii de replicare se întâlnesc într-un punct opus celui de origine. b. La sfârşitul procesului de replicare rezultă două molecule identice, separate fizic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

De la origine, bifurcaţia de replicare se deplasează cu foarte puţine excepţii, în ambele direcţii ale moleculei circulare. Din această cauză, o moleculă de formă circulară, în cursul procesului de replicare are aspectul literei greceşti theta (θ), iar mecanismul de replicare se numeşte *theta*.

Rezultatul replicării este o pereche de molecule circulare, denumite *catenani*. Catenarea este procesul de legare a două molecule circulare de ADN într-o structură supramoleculară, iar decatenarea este procesul invers, de separare a celor două molecule.

La herpesvirusuri, genomul este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, de 150 kbp. Molecula este alcătuită din două domenii cu secvenţă unică: unul mai mare, notat cu *L* (*L*arge), şi altul mai scurt, *S* (*S*hort).

La *Herpes simplex virus* (HSV), fiecare din cele două secvenţe este flancată la extremităţi, de câte o secvenţă de nucleotide repetate în ordine inversată (SRI), de câte 300-400 de baze. O particularitate a genomului HSV este orientarea întâmplătoare a celor două secvenţe unice, astfel încât, într-o populaţie de virioni se găsesc simultan cele 4 variante de genom linear: *P* (*P*rototip), *IL* (*I*nverted *L*), *IS* (*I*nverted *S*) şi *ISL* (Inverted *S* şi *L*). Ele apar ca o consecinţă a recombinării aleatoare a celor două secvenţe genomice.

Replicarea genomului se face prin intermediul moleculelor circulare. După ce ADN viral ajunge în nucleul celulei, secvenţele terminale repetate în ordine inversă (SRI) sunt supuse acţiunii limitate a unei exonucleaze, la nivelul uneia dintre catene. Secvenţele rămase se împerechează, formând o moleculă circulară, dublu catenară, covalent închisă.

Într-o primă etapă, replicarea moleculei circulare se face ciclic, după modelul semiconservativ al *cercului simplu*. Ulterior, moleculele circulare generate în prima etapă a transcrierii se replică după modelul *cercului rotativ*.

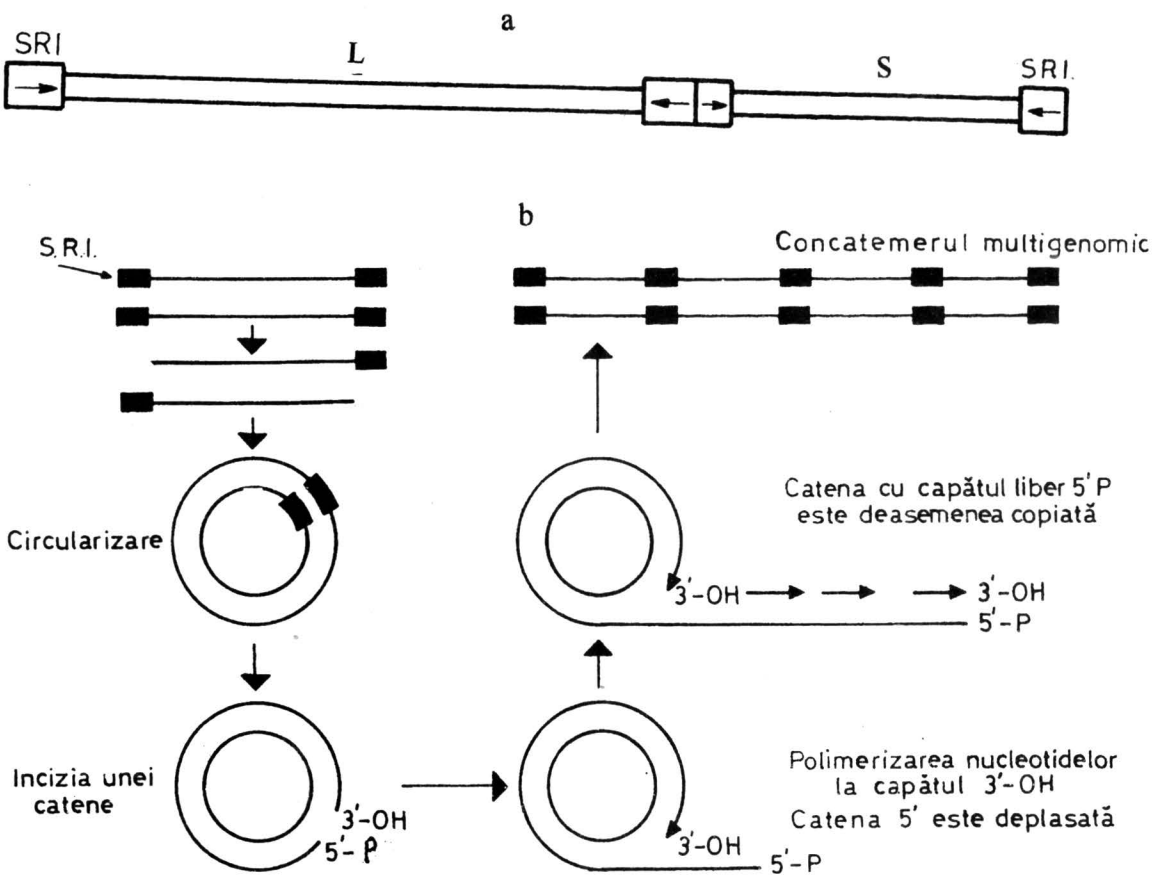


Fig. 123. Ilustrarea diagramatică a structurii genomului la herpesvirusuri. a. Genomul ADN dublu catenar linear este alcătuit din două module informaţionale (domenii): unul mare (L) şi altul mic (S), cu secvenţă proprie de baze, delimitate de secvenţe de baze repetate invers (SRI). b. Ilustrarea schematică a replicării ADN genomic al herpesvirusurilor, după modelul cercului rotativ (după Davis, 1990).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Una din catenele moleculei circulare (catena "leading"[x]) este incizată la un situs specific, sub acţiunea unei endonucleaze virale şi rezultă două capete libere: 3'OH şi 5'P. Cealaltă catenă rămâne circulară, închisă covalent.

La capătul 3' al catenei incizate (catena "leading") este iniţiată sinteza replicativă. Capătul 3'OH are rol de *primer* şi creşte prin polimerizarea nucleotidelor, catalizată de ADN-polimeraza. Catena circulară funcţionează ca *matriţă rotativă*.

Polimerizarea are loc totdeauna, prin alungirea unei catene primer în direcţia 5'→ 3', începând de la capatul 3'OH al catenei incizate. Când bifurcaţia de replicare a parcurs cel puţin odată catena circulară cu rol de matriţă şi catena incizată (leading) este de două ori mai lungă în raport cu momentul iniţial, ea poate fi copiată în sens invers, pe calea replicării discontinue a fragmentelor Okazaki, de un alt complex enzimatic de replicare. Astfel, molecula nou sintetizată devine dublu catenară.

Catena leading continuă să se rotească pe matriţa circulară, fiind copiată succesiv. Se formează astfel mai multe molecule concatemere, în tandem, în conexiune cap-coadă.

Rezultatul intermediar al replicării este un cerc cu o ramificaţie laterală, care se aseamănă cu litera grecească sigma (σ) şi de aceea, replicarea după modelul cercului rotativ se numeşte *replicare sigma*.

Concatemerul poate fi separat de molecula circulară prin clivare, sub acţiunea unor endonucleaze. La rândul lor, capetele catenei incizate ale moleculei circulare sunt reunite sub acţiunea unei ligaze şi se reface continuitatea covalent închisă a structurii circulare dublu catenare.

În procesul morfogenezei virale, concatemerii lineari sunt clivaţi în molecule dublu catenare lineare, de lungimea genomului.

Replicarea după modelul cercului rotativ are următoarele caracterstici: a) catena leading este legată covalent de catena parentală; b) replicarea repetată pe matriţa circulară generează o ramificaţie laterală concatemeră, legată covalent.

Parvovirusurile au ca genom o moleculă de ADN monocatenară, lineară. Capetele moleculei au secvenţe palindromice[x], repetate în ordine inversă, care formează "bucle în ac de păr". Regiunile palindromice terminale reprezintă 5% din genom şi sunt esenţiale pentru replicarea acestuia, deoarece constituie secvenţele primer pentru acţiunea catalitică a ADN-polimerazei. Replicarea este catalizată de aparatul enzimatic al celulei.

Într-o primă etapă, genomul monocatenar este convertit la forma dublu catenară, denumită *intermediar de replicare*, ce formează o structură dublu catenară prin împerecherea bazelor complementare.

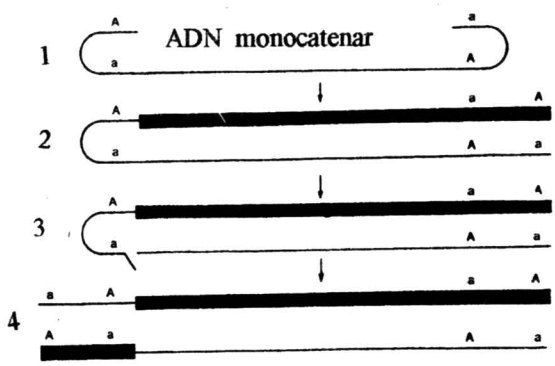
Intermediarul dublu catenar este incizat într-o poziţie opusă situsului de iniţiere pentru sinteza catenei complementare şi generează un capăt 3'OH, de la care secvenţa repetitivă este alungită pe catena complementară cu rol de matriţă. Se sintetizează astfel, catene multiple cu polaritate genomică (pozitivă). Catenele nou sintetizate, cu polaritate genomică rămân în configuraţie lineară şi constituie genomul virionilor progeni sau se replică după acelaşi mecanism, amplificând rata sintezei catenelor genomice.

---

[x] Catena "leading" (*to lead*, englez = a conduce) este cea care expune capătul 3'OH liber şi este transcrisă într-o catenă complementară continuă în direcţia 5' → 3'.

[x] Palindromul este o succesiune de baze, simetrică faţă de un punct central, astfel încât secvenţa bazelor este aceiaşi atât, în sensul 3' → 5', cât şi în sensul 5' → 3'.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Forma replicativă dublu-catenară a ADN

Fig. 124. Modelul replicării genomului ADN monocatenar al parvovirusurilor. Primul stadiu constă în generarea moleculei ADN dublu catenare, care este forma de replicare (RF). (1) Sinteza catenei complementare este inițiată la capătul 3′ cu rol de primer. (2) *A* și *a* reprezintă regiunile cu secvență complementară ale ADN genomic, la capetele 5′ și 3′, care permit formarea structurilor în buclă. Sinteza ADN progresează spre capătul 5′ al ADN genomic și formează o structură în ac de păr; (3) Catena de ADN parental a duplexului este clivată la o secvență opusă situsului de inițiere a sintezei. (4) Sinteza ADN se reinițiază la gruparea 3′OH și se restabilește forma replicativă dublu catenară a ADN (după Pennington, 1990).

Replicarea genomului viral ARN

In citoplasma celulelor animale și umane, activitatea ARN-polimerazei nu este detectabilă. Toate ARN-polimerazele dependente de ARN din celulele animale sunt codificate de virusurile cu genom ARN. De cele mai multe ori, la ribovirusuri, procesele de replicare și transcriere nu sunt separate în timp și spațiu, ci interferă, datorită faptului că ARN genomic funcționează alternativ ca matriță pentru *copierea replicativă* a ARN genomic sau pentru *transcrierea ARN mesager.*

Replicarea genomului ARN monocatenar se face totdeauna după următorul model: catena genomică este convertită la forma dublu catenară, sub acțiunea catalitică a unei enzime de replicare (o ARN-polimerază dependentă de ARN), de origine virală, prin sinteza unei catene complementare de aceiași lungime. Catena nou sintetizată rămâne asociată cu catena parentală, care a avut rol de matriță, formând o structură dublu catenară, denumită *formă de replicare.* Forma dublu catenară de ARN este suportul sintezei replicative a ARN genomic și a ARNm. ARN-polimeraza nu necesită existența unui primer pentru a iniția sinteza catenei noi.

Sinteza noilor catene are loc după mecanismul *conservativ asimetric.* Din forma de replicare dublu catenară, catena genomică parentală este deplasată progresiv de catena nouă, în curs de sinteză. Catenele nou sintetizate au aceiași secvență de baze și aceiași polaritate ca și catena genomică. Sinteza catenelor noi este succesivă și completă, adică sinteza catenei următoare nu începe până ce precedenta nu s-a eliberat.

Forma de replicare dublu catenară, împreună cu o catenă nascentă formează un *intermediar de replicare.*

Catenele nou sintetizate, cu polaritate genomică se asociază cu proteinele capsidale.

La virusurile care au ca genom o catenă de ARN cu polaritate pozitivă (*Picorna, Togavirus*), catena de sens pozitiv a formei dublu catenare este deplasată de catena nascentă a intermediarului de replicare. Catenele de sens pozitiv vor îndeplini două roluri:

a) rolul de ARNm, după prelucrarea prin bonetare[x] (metilare la capătul 5'), metilare internă și adenilare la capătul 3';

b) catenele de lungimea genomului funcționează ca matrițe pentru sinteza unor catene noi, de polaritate negativă. La rândul lor, acestea au rol de matrițe pentru sinteza catenelor de polaritate pozitivă (cu funcție de ARN genomic sau ARNm), amplificând rata sintezei ARN cu specificitate virală.

Pentru replicarea virusurilor cu *genom ARN de polaritate pozitivă*, esențială este capacitatea ARN genomic de a funcționa ca ARNm. Acest fapt are două consecințe:

a) enzimele necesare replicării virale sunt sintetizate în celulă, după infecție, și de aceea nu trebuie să fie componente ale virionului. Din această cauză, ARN genomic este infecțios;

b) deoarece genomul viral este monopartit, produsul traducerii este o *poliproteină*, care este repede clivată în proteinele virale funcționale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

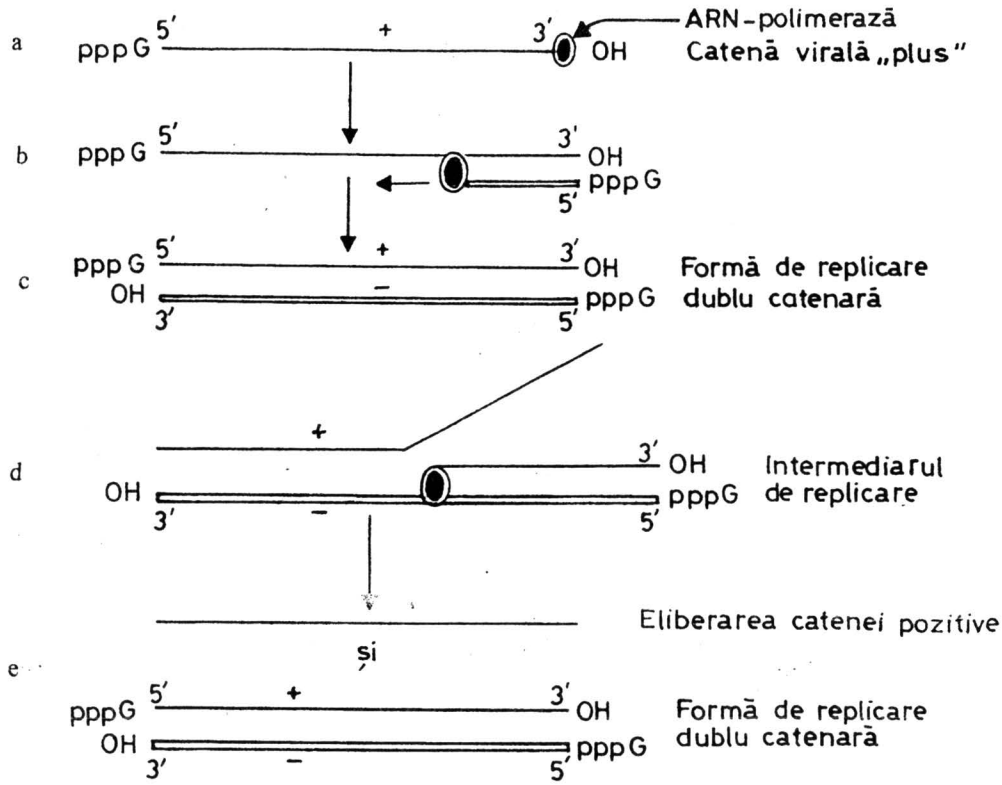


Fig. 125. Modelul replicării genomului viral ARN cu polaritate pozitivă. Amănunte în text.

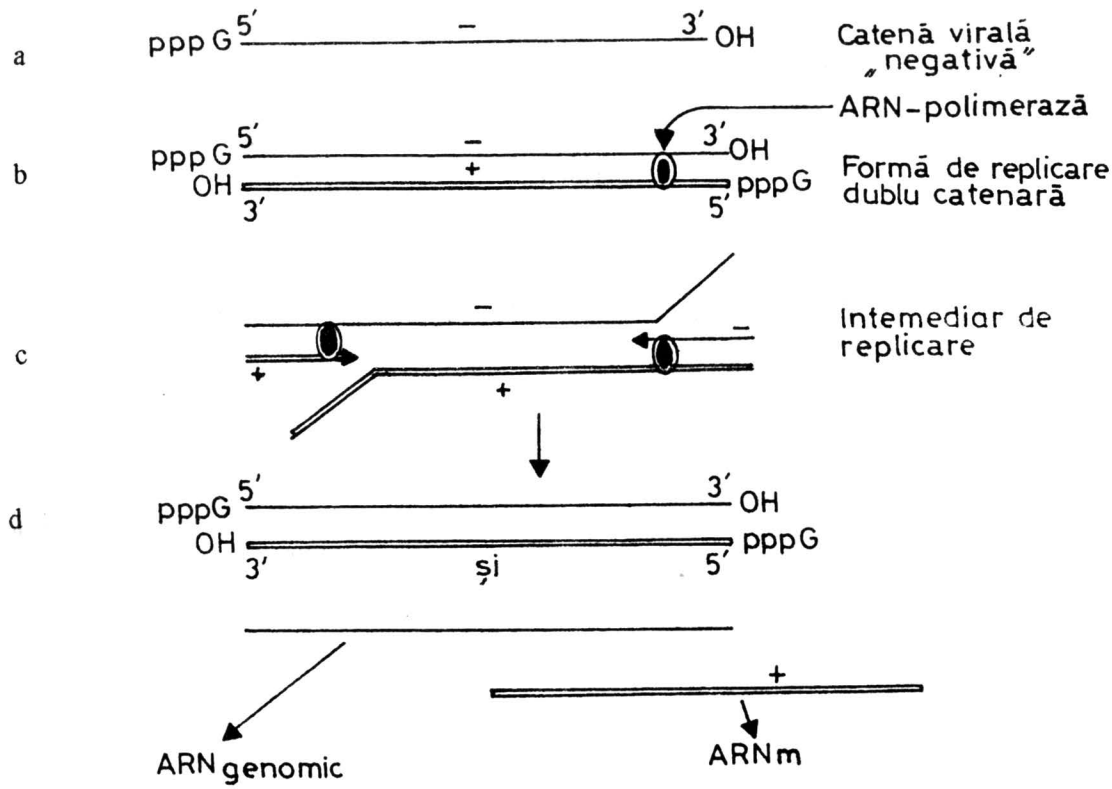


Fig. 126. Modelul replicării genomului viral ARN cu polaritate negativă. Amănunte în text.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

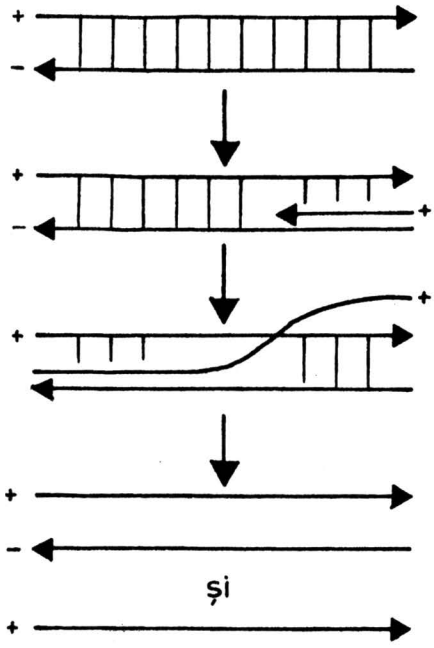


Fig. 127. Modelul replicării genomului ARN dublu catenar al reovirusurilor.

Pentru virusurile cu *genom ARN de polaritate negativă* (paramixo-, rhabdo-, filovirusuri, care alcătuiesc grupul *Mononegavirales*), esenţial este faptul că forma de replicare dublu catenară funcţionează ca matriţă pentru transcrierea ARNm monocistronici şi a unor copii de polaritate negativă, cu rol de ARN genomic. ARNm este transcris de pe catena de polaritate negativă (catena genomică) a formei de replicare dublu catenară, iar ARN cu funcţie genomică este copiat după catena de polaritate pozitivă a formei dublu catenare.

Virionul conţine o transcriptază proprie – o ARN-polimerază dependentă de ARN - care funcţionează în celulă. Enzima catalizează sinteza catenei de ARN complementar şi a ARNm. De aceea, ARN purificat al acestor virusuri nu este infecţios.

Virusurile cu genom ARN se multiplică în citoplasmă, cu excepţia orthomixovirusurilor, în al căror ciclu de replicare survine o etapă nucleară. La orthomixovirusuri, transcrierea moleculelor cu rol de ARNm, ca şi a celor de polaritate negativă cu funcţie genomică, este catalizată de aceiaşi ARN-polimerază virală. Copiile de polaritate pozitivă, cu rol de ARNm sunt "bonetate" (capping), metilate şi poliadenilate de enzime celulare nucleare şi sunt transferate în citoplasmă, iar catenele antigenomice (de sens pozitiv) rămân în nucleu, cu rol de matriţă pentru sinteza ARN genomic (de polaritate negativă), pe toată durata procesului infecţios.

Replicarea genomului ARN dublu catenar multipartit al reovirusurilor (10 segmente) este simultană cu transcrierea. Catena de polaritate negativă a fiecăruia din cele 10 segmente genomice este transcrisă în capsida parţial deschisă, de o ARN-polimerază proprie virionului. Se sintetizează 10 tipuri de ARN cu polaritate pozitivă, care părăsesc capsida prin dizlocarea capsomerelor de la vârfurile icozaedrului. Transcrierea este *conservativă,* deoarece ambele catene ale ARN genmic rămân în regiunea centrală, nedezvelită a virionului.

Moleculele de ARN au două funcţii:

a) sunt traduse în mesaje monocistronice şi astfel se sintetizează proteine virale;

b) se asamblează cu o precapsidă şi au rolul de matriţe pentru sinteza catenelor complementare, de polaritate negativă. Catenele perechi constituie genomul viral.

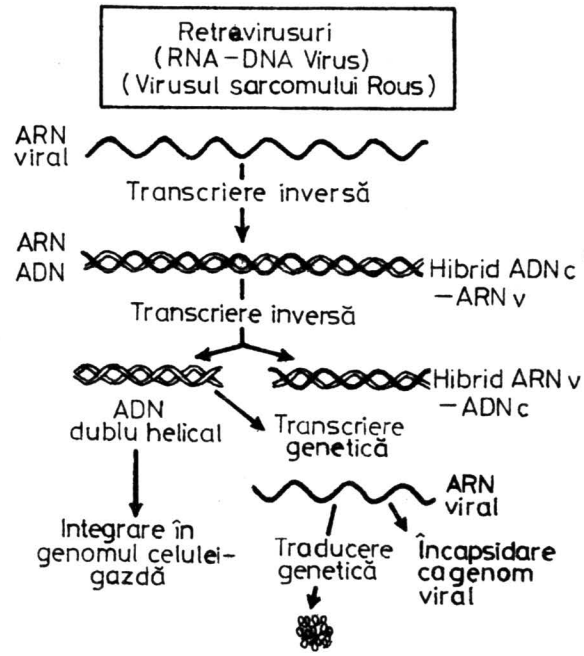
Replicarea ARN genomic printr-un intermediar ADN este caracteristică retravirusurilor. Informaţia lor genetică este transcrisă într-o catenă de ARN, care, în fiecare virion se găseşte în dublu exemplar, ceea ce conferă caracterul *diploid* al genomului acestor virusuri. Nu se cunoaşte modul de asociere fizică a celor două molecule de ARN.

Genomul ARN al retravirusurilor este replicat printr-un flux de informaţie genetică ce trece prin ADN, proces denumit *transcriere inversă.* Singura funcţie a ARN genomic este de a îndeplini rolul de matriţă pentru sinteza intermediarului de ADN în celula infectată. Celula nu posedă o enzimă care să îndeplinească această funcţie. Virionul conţine o ADN-polimerază dependentă de ARN, denumită, din această cauză, *revers-transcriptază* (RT), precum şi molecule de ARNt încorporate din celulă în procesul asamblării, care îndeplinesc rolul de *primer* al transcrierii inverse, deoarece ADN-polimeraza nu iniţiază sinteza unei catene noi, ci doar alungeşte una preexistentă.

[x] Bonetarea sau capping (*cap*, englez = bonetă) semnifică o etapă a prelucrării post-transcriere a moleculei de ARNm, ce constă în adăugarea la capătul 5' a metil-G. "Bonetarea" este esenţială pentru interacţiunea moleculei de ARNm cu ribosomii în procesul traducerii informaţiei genetice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 128. Succesiunea etapelor transcrierii şi traducerii informaţiei genetice la retravirusuri.



Procesul transcrierii începe timpuriu, deoarece RT se activează imediat ce virusul a ajuns în celula sensibilă. Etapele replicării ARN viral sunt următoarele:

a) Legarea complexului molecular al RT, de ARN genomic viral;

b) Sinteza unei copii de ADN complementar, catalizată de RT, care rămâne legată prin punţi de H, de ARN genomic. Rezultă un hibrid molecular ARN-ADN;

c) Digestia selectivă a ARN genomic, din hibrizii moleculari ARN-ADN, sub acţiunea RN-azei H, sau chiar sub acţiunea RT;

d) Sinteza unei catene complementare de ADN viral. Astfel se formează o moleculă dublu catenară de ADN viral, care este translocată în nucleul celulei infectate şi se *integrează* covalent în structura unui cromosom al celulei. ADN viral este integrat stabil şi din punct de vedere structural nu se distinge de secvenţele de ADN cromosomal.

ADN integrat este transcris în două tipuri de molecule de ARN: unele *scurte* (subgenomice), cu rol de ARNm şi altele *lungi*, cu funcţie genomică. La retravirusurile transductoare, copiile lungi de ARN încorporează secvenţe *oncogene* (protooncogene), derivate din celula gazdă.

Activitatea ADN-polimerazică a RT necesită o matriţă de ARN sau ADN şi, ca toate ADN-polimerazele cunoscute nu iniţiază sinteza ADN *de novo*, ci necesită o moleculă preexistentă (primer). In *vitro*, primerul poate fi ARN sau ADN, dar *în vivo*, totdeauna este ARN.

Pentru sinteza catenei ADN de polaritate negativă, rolul de primer îl are molecula de ARNt, originară în celulă. Pentru sinteza celei de a II-a catene de ADN, molecula de ARN genomic este incizată la nivelul secvenţei polipurinice (PP) şi funcţionează ca primer.

Toate revers-transcriptazele, pentru activitatea *in vitro* au nevoie absolută de cationi bivalenţi: Mg^{2+} (10 mM).

Activitatea RN-azei H este inerentă în toate preparatele de revers-transcriptaza. Ea hidrolizează ARN-genomic din hibridul ARN-ADN, pe măsură progresiei celei de a II-a catene de ADN.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Biosinteza proteinelor tardive

Categoria proteinelor tardive cuprinde pe acelea care se sintetizează după replicarea genomului viral. Ele sunt în primul rând, *proteine structurale,* necesare asamblării virionilor progeni şi se sintetizează cu o rată înaltă, prin transcrierea şi traducerea copiilor genomice multiple, rezultate prin replicare. De aceea, proteinele tardive se sintetizează în cantităţi mari, uşor detectabile pe imaginile electrono-optice sau la analiza electroforetică. De exemplu, în celulele infectate cu adenovirusuri, proteinele tardive se sintetizează în mare exces şi formează incluziuni mari, în care agregatele moleculare au o distribuţie ordonată, paracristalină. Alte proteine tardive au *rol funcţional*:

- *proteinele reglatoare*, al căror rol s-a demonstrat mai întâi pentru bacteriofagi, iar ulterior, pentru adeno- şi herpesvirusuri. Cantităţile de proteine necesare asamblării diferitelor structuri virale sunt foarte diferite şi proporţiile sintezei trebuie corelate direct cu necesarul;

- *proteine de morfogeneză*, necesare asamblării virusurilor cu structură complexă; proteine care uşurează *eliberarea* virionilor din celulă.

Pentru sinteza proteinelor tardive, virusurile folosesc aparatul celular de sinteză şi exploatează mecanismele celulare pentru transportul şi modificarea proteinelor traduse.

Pentru utilizarea maşinăriei de sinteză a celulei, virusurile intră în competiţie cu mecanismele sintezei proteinelor celulare. Unele reuşesc să domine şi să uzurpeze mecanismele sintezelor specifice celulei, rezultatul fiind reorientarea aparatului de sinteză în sensul specificităţii virale. Consecinţa este efectul *citolitic*, care la rândul său este substratul manifestărilor patologice ale infecţiei virale. De exemplu, liza motoneuronilor medulari, după infecţia cu virusul polio (un picornavirus) produce paralizia. Mecanismele moleculare ale schimbării specificităţii aparatului de sinteză celulară sunt multiple:

- unele virusuri întrerup selectiv sinteza proteinelor celulare, fie prin inactivarea factorilor specifici ai sintezelor celulare, fie prin favorizarea transcrierii şi traducerii informaţiei genetice virale;

- virusurile complexe (pox, herpes) codifică sinteza unor factori care degradează rapid ARNm celular;

- virusurile al căror ARNm este asemănător cu ARNm celular (de exemplu, al adenovirusurilor) sunt foarte eficiente în competiţia traducerii ARNm;

- virusurile herpetice produc dezagregarea polisomilor celulari.

Transportul proteinelor virale. Proteinele virale tardive au localizări diferite în funcţie de sediul morfogenezei virionilor (în citoplasmă sau în nucleu): o parte rămâne în celulă, iar o altă parte este transportată la nivelul membranei, având rol în procesul înmuguririi virale.

Ca şi proteinele celulare, cele virale se sintetizează pe ribosomii legaţi de membrane sau pe ribosomii liberi în citoplasmă, în funcţie de destinaţie. In celula normală, ribosomii asociaţi membranelor, sintetizează proteine şi glicoproteine de membrană, iar ribosomii liberi sintetizează enzime şi alte proteine citoplasmatice. Pentru localizarea diferită a proteinelor este determinantă secvenţa de aminoacizi de la capătul N-terminal al polipeptidului, denumită *secvenţa semnal*, dar şi alte secvenţe ale polipeptidului, ca şi modificările ce survin după sinteză. Toate orientează proteina spre diferite localizări: intrarea în nucleu, inserţia în membrană etc. Determinanţii care orientează destinaţia proteinei se numesc *semnale de triere*. Semnalele au caracter de specificitate şi constau din scurte secvenţe de aminoacizi care se adaugă polipeptidului în cisternele aparatului Golgi. În funcţie de destinaţie, proteinele vor fi segregate şi împachetate în vezicule separate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prelucrarea proteinelor. Adeseori, proteinele virale se sintetizează sub forma unor precursori de dimensiuni mai mari, care sunt supuşi clivajului proteolitic, fie în timpul sintezei, fie ulterior. Clivările sunt catalizate de proteaze celulare şi mecanismul lor este similar cu acela al clivării proteinelor celulare. Astfel, proteinele virale cu destinaţie membranară, pierd secvenţa N-terminală, înainte de terminarea sintezei. Proteinele structurale sunt, adeseori, clivate în timpul asamblării virionilor.

Glicozilarea proteinelor virale, consecutivă traducerii informaţiei genetice urmează acelaşi mecanism ca şi glicozilarea proteinelor celulare. Toate proteinele expuse pe suprafaţa învelişului sunt glicozilate. Rolul glucidelor din molecula glicoproteică pare a fi de protecţie faţă de factorii extracelulari. Proteinele ce intră în structura nucleocapsidei nu sunt niciodată glicozilate. Resturile glucidice ale glicoproteinelor virale şi celulare sunt N-lincate (legate de asparagină) şi conţin secvenţa Man-GlcNac-GlcNac sau O-lincate de treonină şi serină, formate din 1-3 resturi. Glicozilarea N-lincată începe în timpul sintezei polipeptidului în reticulul endoplasmic, cu adăugarea în bloc a oligozaharidului precursor, legat de un lanţ lipidic lung nesaturat cu rol de purtător, denumit *dolichol*. Procesul este catalizat de transferazele celulare.

Resturile glucidice O-lincate sunt adăugate totdeauna în cisternele Golgi. Diferitele zaharuri ale catenei oligozaharidice sunt adăugate secvenţial, fiecare reacţie fiind catalizată de o glicozil-transferază specifică.

Unele proteine virale sunt *fosforilate*. Ele interacţionează cu ADN şi au rol în replicarea ADN sau în transcriere. Altele sunt *acilate*, prin legarea covalentă a acizilor graşi.

Sinteza glicoproteinelor de înveliş este cunoscută la orthomixo- şi paramixovirusuri. Ele se sintetizează pe poliribosomii ataşaţi cisternelor de reticul endoplasmic. De aici migrează în cisternele golgiene şi se glicozilează sau suferă alte modificări (acilare cu acid palmitic sau miristic). Prin vezicule de transport, glicoproteinele sunt transportate la nivelul membranei şi se inseră pe faţa externă a acesteia. Proteina matriceală (M), neglicozilată se agregă prin interacţiuni necovalente, pe faţa internă a membranei citoplasmatice, în zone distincte ("petice").

Asamblarea (morfogeneza) virală

Studiul dinamicii asamblării virusurilor infecţioase pentru celula animală este îngreunat, pe de o parte, datorită complexităţii structurale a capsidei, iar pe de altă, datorită abundenţei componentelor moleculare ale mediului celular în care are loc asamblarea. Cunoştiinţele referitoare la mecanismele dominante ale asamblării virale sunt rezultatul studiilor morfogenezei bacteriofagilor şi a virusurilor infecţioase pentru plante.

Morfogeneza virală se supune principiului fundamental al *autoasamblării*, ca rezultat al faptului că fiind determinante de formă, capsomerele se pot asocia într-o modalitate unică.

La virusurile cu simetrie helicală (de exemplu, virusul mozaicului tutunului – VMT), capsida se asamblează pe măsură ce capsomerele interacţionează cu ARN genomic. La acest virus s-a demonstrat pentru prima dată, existenţa unei relaţii fixe între genom şi capsomere, precum şi mecanismul autoasamblării. Genomul VMT este alcătuit din 6390 de nucleotide. Dacă fiecare capsomeră, în procesul morfogenezei capsidei, se asociază cu trei nucleotide, rezultă că lungimea genomului viral determină, în mod obligatoriu, lungimea virionului. Altfel spus, în timpul asamblării virionului, capsomerele se aşează în jurul moleculei de ARN genomic. In absenţa genomului, capsomerele se asamblează în număr foarte mare, formând o capsidă imensă, dar goală.

La VMT, molecula proteică este în acelaşi timp, unitate chimică şi unitate structurală a capsidei (capsomera). În anumite condiţii de mediu (creşterea valorii pH), capsida se dezorganizează în capsomerele componente. Restabilirea condiţiilor de mediu, induce autoasamblarea capsidei cilindrice, deoarece capsomerele sunt determinante de formă, adică se pot asambla într-un singur mod, după principiul de construcţie a simetriei helicale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

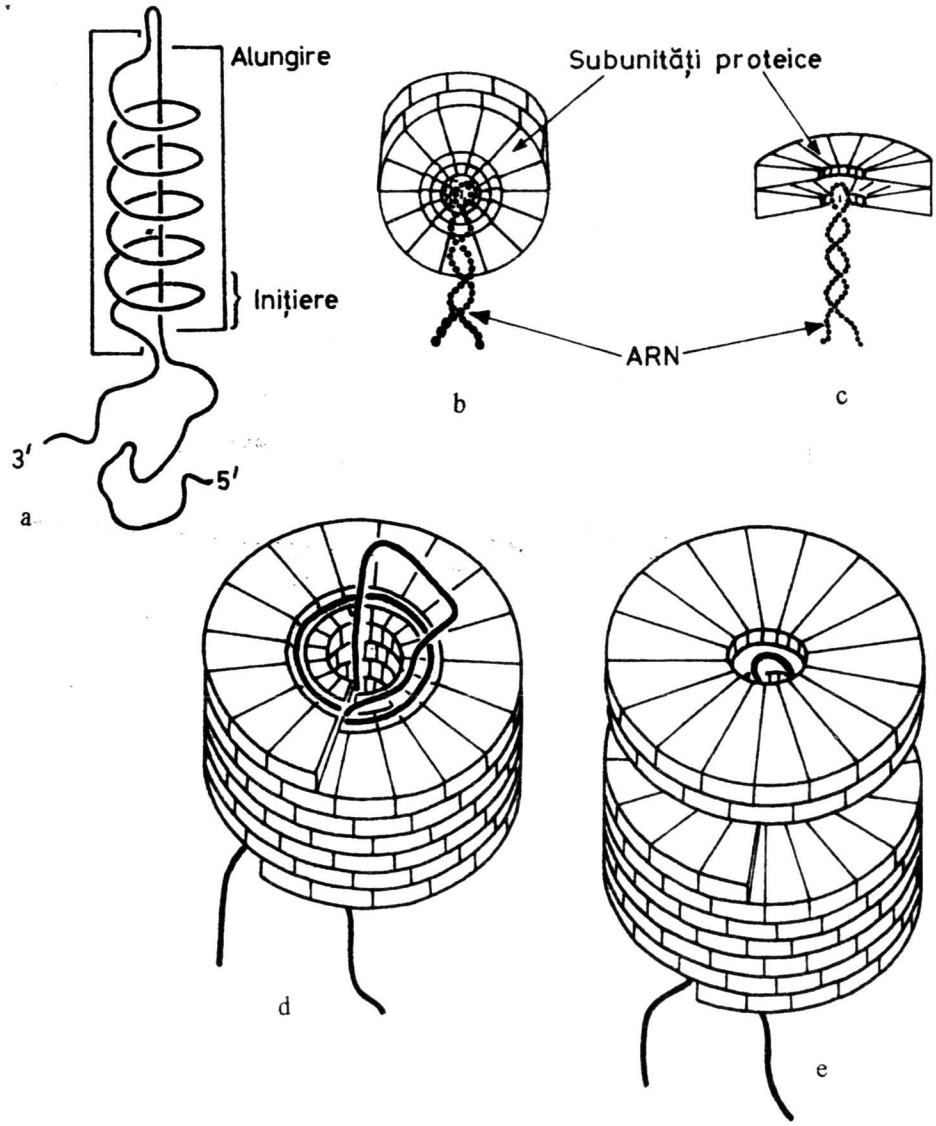


Fig. 129. Procesul autoasamblării semnifică interacţiunea genomului cu capsida. a. La VMT, structura în „ac de păr" a genomului cu regiunea de iniţiere, se leagă de primul disc dublu format din capsomere pentru a iniţia asamblarea virionului. b, c. Inserţia ARN viral în scobitura centrală a discului dublu format din capsomere. d, e. Alungirea virusului se realizează prin afăugarea succesivă a discurilor duble de capsomere.

Mecanismul autoasamblării capsidei VMT este următorul: iniţial se formează un complex stabil, de 17 unităţi proteice (capsomere), în formă de disc, aşezate într-un strat unic. Ele se agregă spontan pentru a forma un disc alcătuit din două straturi ce conţin 34 capsomere. Fiecare strat al discului conţine 17 capsomere, aproape acelaşi cu numărul de capsomere (16,3), într-un tur al helixului VMT. Discul alcătuit din două straturi de capsomere este intermediarul cheie al asamblării VMT. O proprietate importantă a discului este că subunităţile pot să alunece una faţă de altă, pentru a forma un helix cu două tururi.

Discul, alcătuit din două tururi de capsomere interacţionează cu ARN genomic. Asamblarea începe prin inserţia buclei de iniţiere a genomului (secvenţa de împachetare), în spaţiul liber din centrul discului proteic. Discul proteic recunoaşte specific secvenţa de împachetare a genomului. Cu excepţia secvenţei de împachetare, care iniţiază procesul asamblării, proteinele capsidei şi ARN genomic interacţionează nespecific. Prin interacţiunea lor nu se formează legături covalente noi, ci numai legături secundare slabe. Ca dovadă a interacţiunii laxe, atât între capsomere, cât şi între capsomere şi ARN, capsida se disociază prin creşterea valorii pH.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Interacţiunea ARN-proteină determină modificări conformaţionale ale capsomerelor, astfel încât discul devine helical cu formă de şaibă şi acoperă capătul 5' al genomului. Astfel începe formarea helixului viral. Un alt disc se adaugă la bucla nou formată de ARN, ce proemină în spaţiul central. O nouă buclă de ARN se formează după asocierea fiecărui disc proteic, alungind capătul 5' prin spaţiul central al virionului.

Virionul este complet asamblat după ce este acoperit capătul 5' al genomului.

În general, virionii cu structură complexă se asamblează gradat, din ansambluri distincte, construite din subunităţi proteice, ce se formează spontan prin agregarea moleculelor proteice individuale.

În esenţă, asamblarea virionilor cu structură complexă, este rezultatul a două procese ce se desfăşoară succesiv sau aproape simultan:

- asamblarea proteinelor structurale în capsomere şi a acestora în structura capsidei. La virusurile complexe, capsomera ca unitate de construcţie, este alcătuită din câteva molecule proteice;
- asocierea capsidei cu acidul nucleic genomic.

La ribovirusurile nude, cu simetrie icozaedrică, asamblarea capsidei şi asocierea ei cu ARN sunt procese aproape concomitente, datorită instabilităţii ARN viral în celulă.

La dezoxiribovirusurile cu simetrie icozaedrică (adeno-, herpetice), ansamblurile proteice pot forma o structură goală, matură, denumită *precapsidă*, înainte de a se asocia cu genomul. Interacţiunea genomului viral (ADN sau ARN), cu proteinele capsidale şi rolul acestor interacţiuni în împachetarea genomului rămân necunoscute.

În procesul asamblării capsidelor cu simetrie icozaedrică, participă proteinele de "cofraj". Ele au probabil, nu numai un rol mecanic, ci şi catalitic în realizarea unor interacţiuni stabile ale moleculelor componente. După asamblarea capsidei şi consolidarea interacţiunilor între capsomere, proteinele de "cofraj" sunt eliminate din structura virionului.

La reovirusuri, segmentele genomice de ARN dublu catenar se asamblează cu o proteină de morfogeneză şi formează regiunea centrală a virionului, pe suprafaţa căreia se asamblează capsida. La adenovirusuri, capsomerele se asamblează pe proteine de "cofraj".

Eliberarea virionilor din celulă se face prin mai multe mecanisme, dependente în primul rând, de natura virusului.

Virusurile nude se eliberează rapid după moartea şi liza celulei. Intr-o mică măsură, virusurile nude (cu genom ARN sau ADN) se eliberează prin modificarea permeabilităţii membranei citoplasmatice.

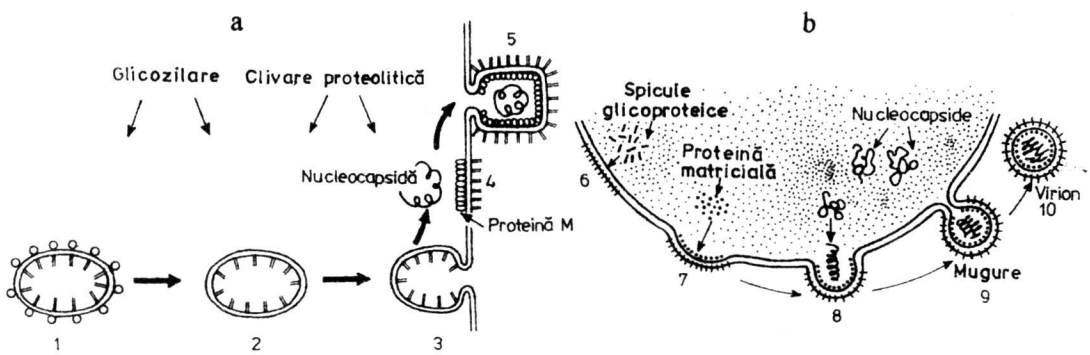


Fig. 130. Morfogeneza învelişului viral. a. Lanţurile polipeptidice ale glicoproteinelor sintetizate pe reticulul endoplasmic rugos (RER) (1) migrează pe calea reticulului endoplasmic neted (REN) şi a aparatului Golgi (2) până la membrana plasmatică (3). În cursul migrării, polipeptidele suferă modificări consecutive traducerii informaţiei genetice: glicozilarea secvenţială în RER şi REN, precum şi clivarea proteolitică la nivelul REN şi al membranei plasmatice (3). Proteina M se leagă de zona din membrana plasmatică în care sunt localizate glicoproteinele virale. Se formează „petice" de înveliş viral, care sunt recunoscute de nucleocapsidele ce „plutesc" în citoplasmă (4). Virusul matur este eliberat prin înmugurire (5). b. Fazele procesului de înmugurire: glicoproteinele virale înlocuiesc proteinele membranare ale celulei-gazdă (6). Proteina matriceală (7) şi nucleocapsida (8) pătrund în mugurele pe cale de formare. Virionul este eliberat (10) prin strangularea mugurelui (9), după care integritatea membranei se reface imediat (după Rott şi Klenk, 1977).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ribovirusurile învelite (mixo-, paramixo, toga-, retravirusuri) se eliberează prin *înmugurire* din membrana citoplasmatică. Ultimele etape ale asamblării nucleocapsidei sunt asociate cu primele stadii ale înmuguririi, sau asamblarea capsidei precede înmugurirea (de exemplu, particulele de tip B şi D ale retravirusurilor). Înmugurirea are loc la nivelul unor situsuri specifice ale membranei celulare, acolo unde proteinele virale s-au inserat, atât pe faţa internă cât şi pe cea externă a membranei plasmatice sau a membranelor reticulului endoplasmic. Asamblarea prin înmugurire necesită co-localizarea componentelor structurale. Noile proteine sintetizate nu iniţiază procesul înmuguririi, până când nu sunt transportate la locul asamblării. Proteinele care proemină pe suprafaţa externă a membranei sau în cisternele reticulului endoplasmic, sunt glicozilate, iar cele care tapetează faţa internă a membranei citoplasmatice sunt neglicozilate. Glicoproteinele virale se inseră în zone distincte ale membranei, din care proteinele celulare sunt deplasate sau chiar înlocuite. Nucleocapsidele se asociază specific cu proteinele virale care tapetează faţa citoplasmatică a membranei (proteina M), sau cu domeniile citoplasmatice ale glicoproteinelor virale inserate în membrană (la togavirusuri).

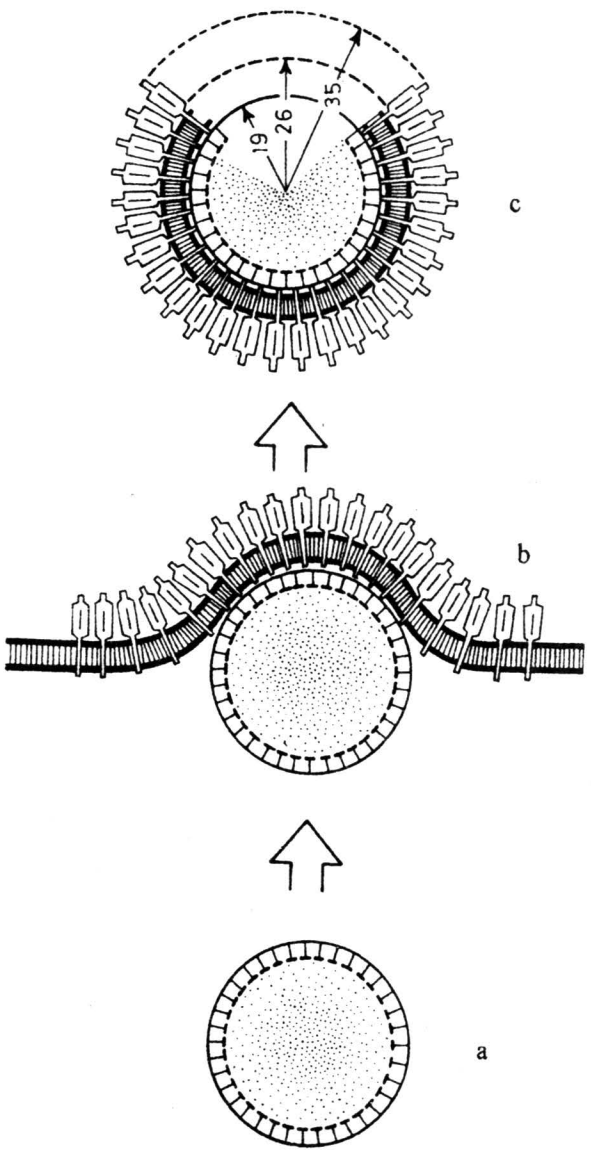


Fig. 131. Modelul de structură a togavirusurilor şi etapele maturării lor. Nucleocapsida unui alphavirus asamblată în citoplasmă (a) migrează spre suprafaţa celulei, unde interacţionează cu glicoproteinele virale şi înmugureşte prin membrana celulară modificată (b), pentru a produce virionul matur (c). Sunt marcate razele diferitelor structuri concentrice (în nm), determinate prin difracţie cu raze X (după Strauss, 1968).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lipidele şi glucidele din alcătuirea învelişului viral sunt proprii celulei. Din această cauză, compoziţia lor în structura unui virus diferă în raport cu substratul celular în care se multiplică. Datorită acestui fapt, preparatele unui virus, obţinute pe linii celulare diferite se deosebesc prin proprietăţile fizice, biologice şi antigenice.

La ortho- şi paramixovirusuri, nucleocapsidele recunosc specific şi se ataşează de proteina matriceală. Ulterior începe înmugurirea şi treptat, virionul se eliberează, învelit fiind de membrana citoplasmatică, în care se găsesc inclavate glicoproteinele virale. Proteina matriceală are rolul unei punţi de legătură între nucleocapsida virală şi glicoproteinele inserate în membrană.

Unele virusuri care înmuguresc, nu sunt foarte eficiente în procesul eliminării proteinelor membranare, iar fenomenul încorporării proteinelor străine este real. De aceea, învelişul viral conţine şi glicoproteine de origine celulară şi chiar ale unui alt virus, care infectează concomitent aceiaşi celulă. Faptul este ilustrat de neutralizarea retravirusurilor, atât *in vivo* cât şi *in vitro*, de anticorpii specifici faţă de proteinele membranare. Proteinele membranare par a fi încorporate pasiv în înveliş, dacă nu împiedică steric formarea acestuia.

Eliberarea virionilor prin înmugurire este mai eficientă pentru randamentul infecţiei (producerea virusului progen), deoarece nu depinde de dezintegrarea imediată a celulei. Celula rămâne viabilă o perioadă mai lungă de timp (sau devine chiar nemuritoare) şi eliberează virus.

La herpesvirusuri, virionii se învelesc la contactul cu lamela internă a membranei nucleare, traversează spaţiul dintre cele două lamele şi la nivelul porilor nucleari trec în cisternele reticulului endoplasmic şi în vezicule. Sistemele membranare închise protejează virionii de contactul cu citoplasma şi mediază transportul la suprafaţa celulei. Membrana veziculei de transport, fuzionează cu membrana citoplasmatică şi virionii sunt eliberaţi în spaţiul extracelular. Herpesvirusurile sunt totdeauna citolitice.

Efectele virusurilor care înmuguresc, asupra celulei gazdă sunt foarte diverse: de la citoliză (toga-, paramixo, rhabdovirusuri), până la supravieţuirea nelimitată a acesteia, după transformarea cu retravirusuri.

Celulele infectate cu virusuri care înmuguresc la nivelul membranei citoplasmatice sau la nivelul altor membrane celulare, devin ţinta antigenică pentru efectorii sistemului imunitar, activaţi după ce recunosc glicoproteinele codificate de virus. Cele infectate cu virusuri nude sunt recunoscute de efectorii sistemului imunitar, deoarece expun antigene virale asociate cu molecule membranare.

Structura şi replicarea virusurilor cu simetrie helicală

Orthomixovirusuri

Prototipul grupului *Orthomyxo* este virusul influenza (gripal), agentul patogen al gripei umane. Denumirea semnifică afinitatea virionilor pentru mucopolizaharidele şi glicoproteinele celulare, în special pentru glicoproteinele membranare ce conţin acid sialic.

La microscopul electronic, pe preparatele colorate negativ, virionii de influenza sunt predominant sferici, cu diametrul de 100-120 nm. În preparatele virale obţinute după primul pasaj în oul embrionat de găină, se observă forme alungite.

Virionul este învelit de peplos, derivat din membrana citoplasmatică în timpul înmuguririi. Pe suprafaţa învelişului, proemină spicule de *hemaglutinină* (HA) şi *neuraminidază* (NA). Sub peplos se găseşte corpul central al virionului, format din *proteina matriceală* (*M*), în care sunt incluse opt molecule de ARN monocatenar, asociate cu *nucleoproteina (NP)* şi cu trei proteine mari, cu funcţie *polimerazică* (PB_1, PB_2, şi *PA*), care catalizează replicarea şi transcrierea ARN.

Genomul virusului gripal este format din opt segmente de ARN monocatenar, lineare, cu lungimi diferite, asociate cu capsomerele (nucleoproteina), ordonate după o simetrie helicală şi cu moleculele de ARN-polimerază. Ansamblul ARN-proteine formează *nucleocapsida.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

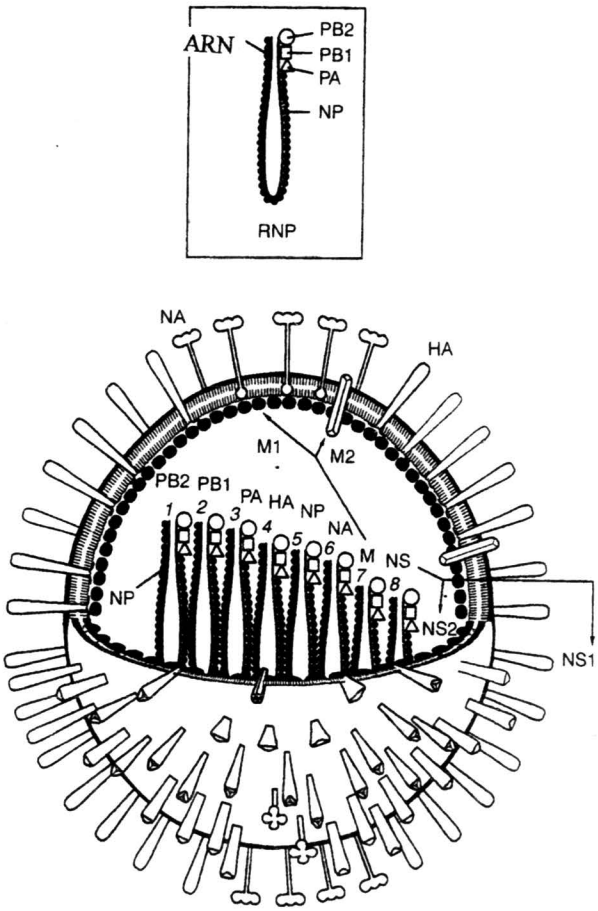


Fig. 132. Structura virionului de influenza. Pe suprafaţa sa predomină spiculele de hemaglutinină (HA) şi neuraminidază (NA). În interior se găseşte proteina matriceală (M) şi cele opt segmente de ARN monocatenar asociate cu nucleoproteina (NP) şi cu cele trei polimeraze (PB_2, PB_1 şi PA). Complexul ARN-NP - polimeraze apare sub forma unui helix. În virion se găsesc mici cantităţi ale proteinei NS_2. În medalion, structura unui helix nucleoproteic. Cele trei polimeraze sunt asociate la extremitatea fiecărui fragment RNP (după Cox, 1996).

Organizarea celor opt segmente genomice de ARN nu este bine cunoscută. Studiile biochimice sprijină ideia că fiecare segment de ARN se găseşte sub forma unui complex ribonucleoproteic distinct, dar microscopia electronică a furnizat imagini care sugerează că regiunea centrală, eliberată din virionul parţial dezintegrat, este un helix unitar, probabil rezultat prin înlănţuirea laxă a segmentelor genomice. Ele se desprind cu usurinţă din complex.

Virusurile gripale aparţin la trei tipuri *antigenice* majore: A (1933), B (1940), C (1947). Diferenţele antigenice se datorează antigenului intern, adică nucleoproteinei asociată cu ARN. Antigenul nucleoproteic (NP) este comun tuturor izolatelor care aparţin aceluiaşi tip antigenic.

Moleculele de ARN sunt lineare, dar fiecare se pliază şi formează o structură de forma unei bucle "în ac de păr". In zonele de complementaritate a bazelor se formează punţi intra-moleculare şi aspectul fiecărui fragment, este acela de dublă catenă. In zonele fără complementaritate, molecula de ARN formează o buclă largă.

Virusul influenza de tip C are şapte segmente genomice.

Glicoproteinele de înveliş

Virusurile influenza A şi B au două glicoproteine de înveliş, *HA* şi *NA*, ce proemină sub forma unor spiculi pe suprafaţa virionului, în număr de 500-1000.

Hemaglutinina (HA) reprezintă 25% din proteinele virale. Denumirea de HA a fost dată de Hirst (1947). El inocula virusul gripal în oul embrionat de găină. După ruperea unui vas de sânge, a observat că hematiile contaminante ale lichidului alantoidian sunt aglutinate. HA sunt glicoproteine care se leagă de receptorii de suprafaţă ai hematiilor şi ai celulelor epiteliului respirator, realizând faza de adsorbţie a virionului.

Molecula de HA este sintetizată ca o catenă polipeptidică unică, dar după traducerea mesajului este clivată. La capătul N-terminal, HA are un peptid semnal de 16 aminoacizi hidrofobi, dar secvenţa este clivată. Al II-lea clivaj conferă funcţionalitate moleculei de HA. Secvenţa următoare de 328 aminoacizi formează subunitatea HA_1, iar ultimii 221 formează subunitatea HA_2. Cele două subunităţi rămân asociate prin legături necovalente şi prin punţi S-S. Ultimii 25-30 de aminoacizi hidrofobi, la capătul C-terminal al subunităţii HA_2, au rolul de a ancora molecula în peplosul viral.

Fiecare monomer, format din subunităţile HA_1 şi HA_2 formează o structură alungită, ce constă dintr-un peduncul de 80 A, ce se termină printr-o regiune globulară, cu diametrul de 40 Å, iar la capătul opus, cu o regiune globulară de 10 Å. Fiecare spicul glicoproteic, vizibil la microscopul electronic, este un trimer de molecule proteice de HA. La extremităţile regiunilor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

globulare mari se găsesc situsurile de ataşare la receptorii celulari: o mică depresiune este locul de legare a sialil-glicolipidelor şi sialil-glicoproteinelor. Din cele şapte catene oligozaharidice, trei sunt localizate pe globulul polar, iar patru pe peduncul, conferindu-i rigiditate şi hidrofilie.

Glicoproteina HA are o accentuată variabilitate antigenică, ceea ce determină epidemiile de gripă şi imposibilitatea de a le controla prin vaccinare.

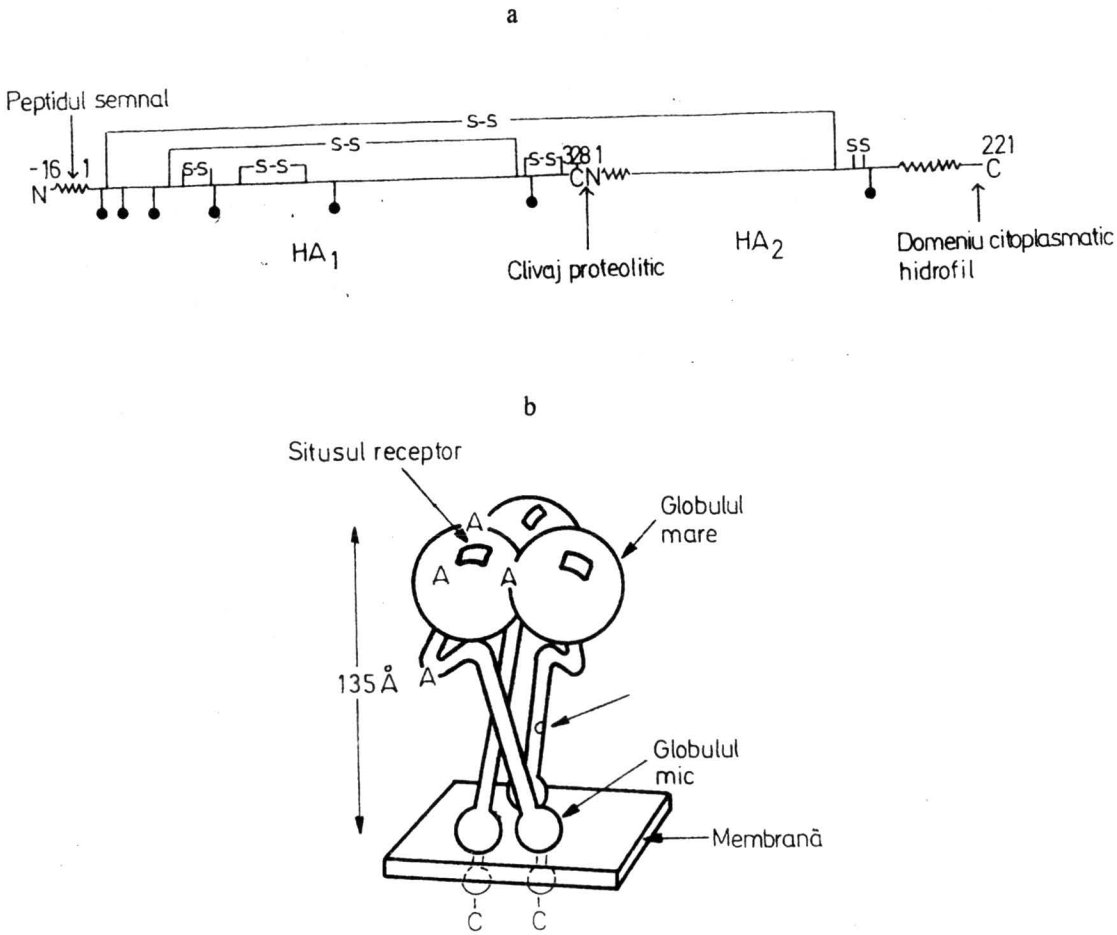


Fig. 133. a. Diagrama structurii primare a hemaglutininei. Sunt ilustrate situsurile legării glucidelor (liniile verticale cu cerc plin), legăturile S-S şi situsul clivării proteolitice care generează HA_1 şi HA_2. b. Diagrama trimerului de hemaglutinină a virusului influenza A Hong Kong/68. Litera A indică cele trei situsuri implicate în variaţia antigenică a HA (după Kingsbury, 1991).

Neuraminidaza (NA) este un spicul în formă de ciupercă, cu un cap de formă paralelipipedică, format din patru subunităţi şi o tijă ce se termină cu o regiune hidrofobă, inclusă în membrana peplosului. Spiculele de NA nu sunt distribuite uniform pe suprafaţa învelişului, ci în "petice"

Neuraminidaza este alcătuită dintr-o singură catenă polipeptidică de 469 aminoacizi, cu o regiune hidrofobă la capătul N-terminal, prin intermediul căreia se ancorează în peplos. După traducerea mesajului, molecula de NA nu este prelucrată. Ea conţine câteva situsuri de glicozilare şi numeroase legături S-S stabilizatoare.

Polipeptidele NA se asociază, se pliază şi formează spicule tetramerice. Tetramerul de NA constă dintr-o tijă subţire, ce se termină butonat, iar cele patru subunităţi polipeptidice, prin pliere formează atât regiunea în formă de cutie, cât şi tija butonată. Funcţiile NA nu sunt bine cunoscute, dar rolul determinant pare a fi acela de *desializare* a glicoproteinelor din peplos. Virionii mutantelor care nu codifică NA se agregă la suprafaţa celulei din care înmuguresc. Aceasta sugerează că rolul NA este acela de a hidroliza acidul sialic al glicoproteinelor virale celulare. Astfel este prevenită agregarea virionilor şi este favorizată eliberarea lor din celulă. La mutantele virale defective ale genei NA, catenele glucidice ale HA conţin acid sialic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

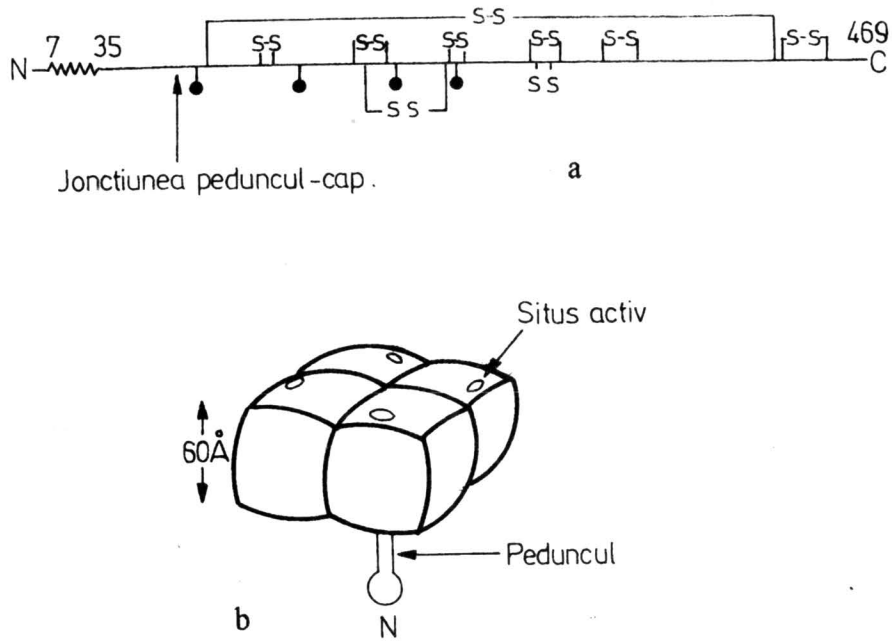


Fig. 134. a. Diagrama structurii primare a neuraminidazei. Secvența aminoacizilor 7-35 este ancorată în peplosul viral. Joncțiunea peduncul-cap este situată între resturile de aminoacizi din pozițiile 73-74. b. Digrama tetramerului de neuraminiadază a virusului influenza A. Regiunea capului are formă de cutie. Capătul N-terminal al pedunculului se ancorează în învelișul viral (după Kingsbury, 1991).

O altă funcție atribuită NA ar consta în penetrarea stratului de mucus ce tapetează epiteliul tractului respirator.

Neuraminidaza nu este importantă pentru variația antigenică a virusului gripal, dar are rol important în asamblarea și eliberarea virionilor. Ariile membranare în care înmuguresc virionii și se formează învelișul viral, conțin numai glicoproteine desializate.

Virionii adsorbiți pe suprafața hematiilor, la 37^0 se desprind. Fenomenul desprinderii se numește *eluție* și se datorează activității NA, cu efect enzimatic asupra receptorilor de virus ai hematiei. Neuraminidaza pare a avea rol în digestia enzimatică a receptorilor celulari de virus, ușurând internalizarea virionului.

Alte proteine virale

Nucleoproteina este o componentă antigenică cu specificitate de tip *A, B* și respectiv *C* (denumirea veche este de antigen *S* (*s*olubil) sau antigen *g* (de *g*rup). În timpul infecției, NP se acumulează în nucleu. Are atât rol structural, deoarece este asociată cu ARN, cât și (se pare) rol în transcriere și replicare.

Proteina matriceală (*M*) este neglicozilată și tapetează interiorul învelișului viral. Se sintetizează două variante antigenice ale proteinei M: M_1 și M_2, ambele codificate de segmentul 7, prin schimbarea cadrului de citire.

Proteinele M pot fi eliberate prin tratamentul particulelor virale cu tampon salin și detergent.

Proteina M_1 este asociată cu ribonucleoproteina. Interacțiunea proteinei M_1 cu ARN este de natură electrostatică. Interacțiunile multiple ale proteinei M_1 cu alte proteine virale și cu ribonucleoproteina, sprijină presupunerea că înmugurirea virusurilor ARN cu genom de polaritate negativă este reglată de această proteină.

Proteina M_2 are rol în stadiul timpuriu al infecției. Ea funcționează ca un canal ionic prin care protonii sunt transportați în interiorul nucleocapsidei. Scăderea valorii pH este decisivă pentru eliberarea nucleocapsidei și pentru succesiunea celorlalte etape ale ciclului de replicare virală.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Proteinele cu funcție *polimerazică*, în număr de trei (PB_1, PB_2, PA) sunt asociate cu nucleoproteina şi cu ARN genomic. Ele catalizează replicarea şi transcrierea ARN genomic. In ciclul infecţios, polimerazele se acumulează în nucleul celulei.

Proteinele nestructurale (NS_1 şi NS_2) sunt codificate de segmentul 8 la virusurile influenza A şi B şi de segmentul 7 la influenza tip C. Se numesc "proteine nestructurale", deoarece, deşi sunt sintetizate în celulă, în ciclul de replicare virală, nu se găsesc în structura virionului. Ambele sunt localizate în nucleul celulei infectate. Proteina NS_1 se acumulează în cantităţi mari, timpuriu în ciclul infecţios şi formează incluziuni paracristaline, iar NS_2 se sintetizează tardiv.

Transcrierea

Fiecare subunitate genomică, din cele opt, codifică sinteza unui polipeptid, cu excepţia a două segmente, care codifică câte două polipeptide. Mecanismul transcrierii genomului virusului influenza este unic, deoarece necesită cooperarea enzimelor virale şi celulare de transcriere.

Catenele de polaritate negativă ale genomului sunt transcrise de o ARN-polimerază dependentă de ARN, codificată de virus, dar deficientă în ceea ce priveşte iniţierea sintezei ARNm şi a metilării capătului 5' al moleculei. Din această cauză, multiplicarea virusurilor gripale are o etapă *nucleară*.

Dovada pentru sediul nuclear al transcrierii ARN a fost adusă de experienţele cu actinomicina D. Antibioticul inhibă transcrierea ADN în celulele eucariote, dar inhibă şi multiplicarea virusurilor influenza, ceea ce contrastează cu lipsa de sensibilitate a replicării ribovirusurilor obişnuite.

Sinteza ARNm de influenza necesită primeri bonetaţi, de 10–13 nucleotide, deoarece polimerazele virale nu iniţiază sinteza catenei, ci doar alungesc una preexistentă. Proteina NS_1 are rol în generarea primerilor bonetaţi, deoarece are şi rol de endonuclează. Ea clivează mesagerii celulari la capătul 5', dar se asociază şi de cozile de poli-A şi inhibă astfel transportul ARNm celular în citoplasmă. Astfel devin disponibili primerii bonetaţi pentru sinteza ARNm viral. Primele copii de ARN viral sunt traduse în polimeraze, în nucleoproteină şi în proteina NS_1. Acestea sunt transportate în nucleu şi devin disponibile replicării genomului viral şi asamblării nucleocapsidelor.

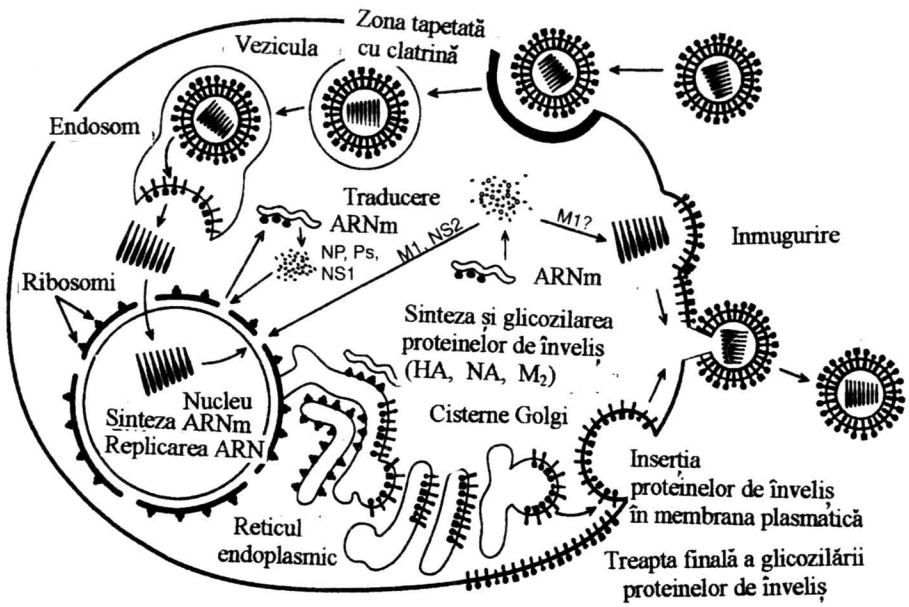


Fig. 135. A. Reprezentarea schematică a ciclului de replicare a virusului influenza: adsorbţia, endocitoza, dezvelirea, deplasarea spre nucleu, transcrierea, sinteza proteinelor structurale neglicozilate (NP, polimerazele, NS1, NS2, M_1), sinteza proteinelor de înveliş (HA, NA, M_2), glicozilarea lor la nivelul cisternelor Golgi, transferul lor în structura membranei, asamblarea şi înmugurirea şi eliberarea virionului matur.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Replicarea ARN la virusurile influenza este strâns corelată cu procesul transcrierii. Ambele procese sunt catalizate de polimerazele virale. Catena genomică, de polaritate negativă este copiată în catene antigenomice, cu polaritate pozitivă. Unele catene de polaritate pozitivă, neprelucrate după transcriere, rămân localizate în nucleu şi au rolul de matriţe pentru sinteza ARN genomic (de polaritate negativă), pe toată durata ciclului de replicare. Alte catene, cu polaritate pozitivă sunt prelucrate de enzimele celulei, prin bonetare la capătul 5' şi prin legarea secvenţei poli-A la capătul 3' şi au rolul de mesageri.

ARNm viral, ca şi ARNm celular este transportat în citoplasmă şi tradus în proteine virale. Unele proteine (HA, NA, proteina M) migrează spre membrana citoplasmatică şi se inseră în stratul dublu fosfolipidic, iar altele (polimerazele, NP, proteinele NS) sunt transportate în nucleu.

Asamblarea virionilor

Cele două componente structurale majore ale virusului influenza se asamblează în compartimente celulare diferite: nucleocapsida se asamblează în nucleu, iar învelişul se constituie la nivelul membranei citoplasmatice.

Unităţile structurale ale nucleocapsidei (NP, polimerazele) sunt transportate în nucleu, unde se asociază cu segmentele genomice de polaritate negativă, iar uneori chiar cu segmente antigenomice (catene de polaritate pozitivă). ARNm nu este recunoscut de proteinele nucleocapsidei, ceea ce sugerează că situsurile de iniţiere şi recunoaştere a încapsidării genomului se găsesc numai în ARN genomic şi nu sunt transcrise în copiile de ARNm.

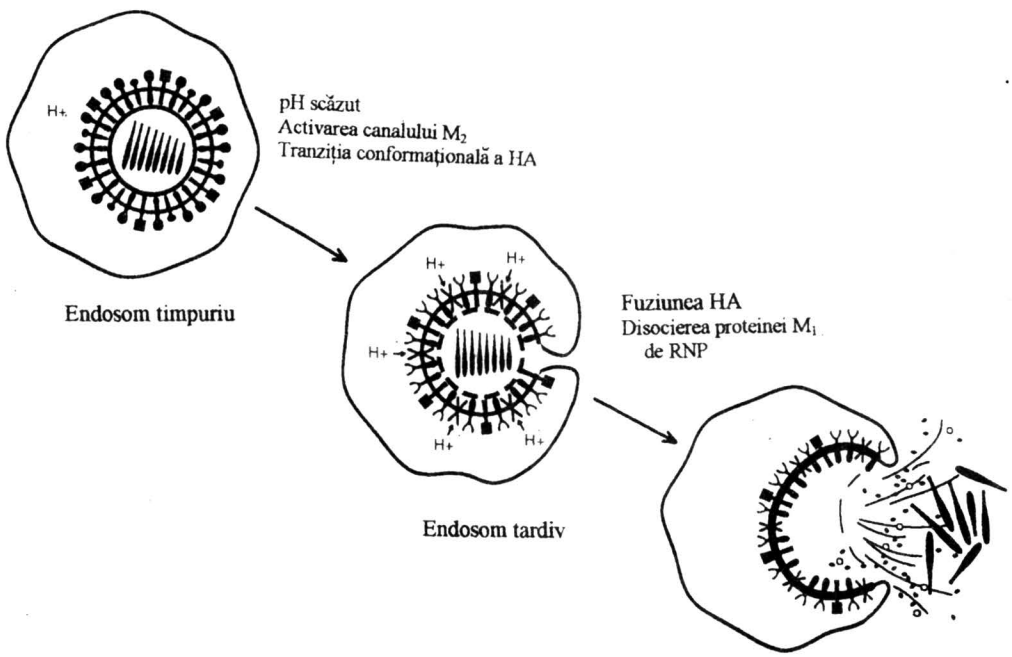


Fig. 136. În endosom, proteina M_2 a învelişului viral are rol de canal ionic. Trecerea H^+ din endosom în interiorul virionului permite disocierea interacţiunilor dintre proteina M_1 şi RNP, ceea ce uşurează transportul nucleocapsidei spre nucleu (după Cox, 1998).

Inmugurirea virusului influenza este iniţiată de asocierea nucleocapsidei cu câteva spicule glicoproteice, inserate în membrana citoplasmatică. Datorită mobilităţii sale reduse, complexul iniţial nucleocapsidă-spicule stimulează legarea mai multor spicule glicoproteice. Asocierea nucleocapsidei cu spiculele produce denivelarea membranei şi înglobarea completă a nucleocapsidei. Inmugurirea virusului influenza este coordonată predominant, de proteina M_1. Analiza electrono-optică a unor ribovirusuri cu genom de polaritate negativă a evidenţiat că proteina M_1 formează un strat dens, strâns asociat cu lamela internă a dublului strat lipidic. La virusurile influenza, proteina M_1 înlocuie complet lamela lipidică internă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Înmugurirea virusului influenza este completă, când particula s-a desprins din membrană. Desprinderea virionului parcurge două etape: a)formarea unui por al mugurelui; 2)fisiunea (clivarea) membranei. Porul mugurelui reprezintă conexiunea dintre virion şi citoplasmă, în stadiul în care membrana virală şi celulară au raporturi de continuitate. În etapa fisiunii, lipidele care delimitează porul, se amestecă şi se reorganizează în membrane separate. Desprinderea virionului pare să necesite funcţii speciale mediate de proteinele virale.

Formarea învelişului viral este precedată de reasortarea proteinelor, în cursul căreia proteinele celulare sunt înlocuite de proteinele virale. Excluderea eficientă a proteinelor celulare se datorează, probabil, interacţiunilor specifice care se formează între glicoproteinele virale, iar ulterior, între acestea şi nucleocapsidă. Interacţiunile multiple ale acestor componente au ca rezultat eliminarea proteinelor celulare.

Reasortarea genetică

Cele opt segmente de ARN ale genomului influenza sunt independente fizic unul de altul şi, teoretic, se comportă asemănător cromosomilor unei celule eucariote în timpul diviziunii.

Virusul influenza a fost primul examinat prin metode genetice cantitative. El se găseşte în natură, în mai multe variante genetice şi antigenice, în funcţie de specia pe care o infectează: virus uman, equin, porcin, aviar. Varianta umană prezintă, la rândul ei, o mare diversitate genetică şi antigenică, ce stă la baza marilor epidemii de gripă. Virozele sunt însoţite, în general, de o imunitate solidă, dar cea antigripală are un efect protector minim şi de aceea epidemiile de gripă sunt însoţite de mortalitate ridicată la cei doi poli ai vârstelor.

Rata apariţiei variantelor genetice noi, la virusul influenza este mult superioară faţă de alte virusuri. Infecţiile experimentale mixte, la animale de laborator cu variante biochimice şi antigenice distincte ale NA, au generat un virus progen "hibrid", cu caracteristicile biochimice şi antigenice ale ambelor linii parentale, ceea ce denotă capacitatea accentuată a acestui virus de a-şi modifica informaţia genetică.

Mecanismul reasortării genomice între virusurile umane şi animale funcţionează, după toate probabilităţile, şi în infecţiile naturale. Virionii progeni conţin tot opt segmente de ARN, dar de origini diferite. Reasortarea genomică este cauza apariţiei unor noi variante antigenice de virus gripal. Dacă două tulpini virale, distincte din punct de vedere genetic şi antigenic infectează aceiaşi gazdă naturală, în celulele infectate, segmentele lor genomice se redistribuie în virionii progeni, astfel încât rezultă combinaţii de segmente genomice de la ambele linii parentale. Fenomenul schimbului reciproc de segmente genomice de ARN s-a denumit *reasortare genetică* şi trebuie deosebit de conceptul tradiţional al recombinării genetice, în cursul căruia, genele sunt redistribuite prin fenomenul de crossing-over. Reasortarea genomică a diferitelor variante genetice de virus gripal este comună, dar probabilitatea emergenţei unei noi tulpini de virus este limitată de probabilitatea mică a interacţiunilor eficiente între segmentele genomice diferite. Deşi segmentele genomice sunt funcţional independente, în virion ele se asociază prin interacţiuni a căror natură nu se cunoaşte.

Reasortările genetice sunt net superioare ca frecvenţă, fenomenelor de recombinare şi au rol esenţial în determinarea ratei înalte a variaţiei genetice şi antigenice naturale a virusului influenza.

Fenomenul reasortării genetice a virusului gripal, explică gravitatea epidemiilor. Populaţia umană este lipsită de protecţie imunitară faţă de noile variante genetice şi antigenice. Reacţiile imunitare protectoare ale organismului sunt stimulate de două antigene virale : HA şi NA. Ele determină formarea anticorpilor specifici, după infecţie şi vaccinare. Anticorpii anti-HA au efect neutralizant asupra infecţiozităţii virionilor, iar anticorpii anti-NA au efect neutralizant nesemnificativ. Nucleoproteina internă induce sinteza anticorpilor specifici, numai dacă este sintetizată în exces şi eliminată extracelular, situaţie în care este expusă contactului cu sistemul imunitar.

Toate cele trei tipuri de virusuri influenza (A, B, C) s-au izolat de la om, dar influenza A este cauza preponderentă a influenzei umane. Numai virusul influenza tip A produce pandemii şi a fost izolat de la om şi de la mai multe specii de animale: porc, cal, păsări etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aceste specii sunt sursele primare de virus. La rața salbatică, virusul influenza nu produce simptome, dar se multiplică în celulele epiteliale ale tractului intestinal și este eliminat cu materialele fecale. Prin ciclul fecal-oral, virusul ajunge la mamifere.

Reasortarea genomică, necesită infecția naturală simultană a unei gazde, cu virus uman și aviar. Porcul este de cele mai multe ori, gazdă intermediară comună pentru virusurile influenza aviar și uman. Aici se produce reasortarea segmentelor genomice. Omul contractează influenza de la porc, dar se pare că nu se poate infecta direct cu virusul aviar. Acesta, spre deosebire de virusul uman este stabil din punct de vedere genetic și antigenic.

Cele mai multe pandemii de gripă, după 1850, sunt originare în regiunile tropicale ale Chinei, unde, spre deosebire de regiunile temperate, infecția gripală se produce tot anul. Densitatea mare populației umane, a păsărilor și mamiferelor domestice (porcul) creează condiții ideale pentru transmiterea interspecifică a virusului influenza și pentru reasortarea segmentelor genomice.

Apariția noilor variante genetice și antigenice de virus gripal este consecința fenomenului cunoscut sub denumirea de "shift genetic"(*shift*, englez = schimbare).

Shiftul genetic este un proces de variație genetică amplă, în cursul căruia segmentele genomice sunt dobândite prin reasortare, de la tulpini de virusuri cu specificități distincte de gazdă. Această formă de variație este caracteristică numai tulpinilor de influenza tip A.

S-au identificat 14 variante antigenice ale HA (H_1-H_{14}) și 9 variante antigenice ale NA (N_1-N_9), ale virusurilor influenza tip A, infecțioase pentru om și animale. Pentru om sunt infecțioase numai H_1, H_2 și H_3 și N_1, N_2, corespunzătoare subtipurilor A_1, A_2 și respectiv A_3.

Fiecare tip antigenic de virus influenza prezintă subtipuri antigenice. Tipul A prezintă subtipurile A_0 (varianta antigenică izolată inițial), A_1, A_2, A_3, ce diferă prin specificitatea antigenică a hemaglutininei. Fiecare apariție a unui nou subtip corespunde propagării unei pandemii.

Este posibil ca următoarea pandemie majoră de gripă să se producă în următoarele decade și se va datora reasortării genetice a virusului gripal sau este posibilă revenirea unei variante genetice mai vechi, care se va propaga într-o populație lipsită de experiența antigenică cu varianta antigenică veche.

Driftul genetic. Variantele antigenice corespunzătoare subtipurilor de virusuri influenza A sunt supuse la rândul lor, unui proces de variație antigenică limitată. In fiecare an, virusul circulant este ușor diferit de varianta precedentă.Variația antigenică sezonieră este restrânsă, dar suficientă pentru ca anticorpii specifici față de ultima variantă a virusului, deși au efect neutralizant față de varianta antigenică precedentă, raportul invers nu este valabil. Variația antigenică de mică amploare, în cadrul căreia se păstrează relațiile serologice încrucișate unidirecționale cu varianta antigenică precedentă se numește *drift* (glisare) *antigenic*. Glisarea antigenică continuă toată durata existenței unui subtip în populația umană.

Driftul genetic presupune acumularea mutațiilor punctiforme, în fiecare din cele opt segmente genomice și se produce între pandemii. Datorită variațiilor antigenice de mare amplitudine, consecințe ale reasortărilor genetice sau variațiilor de mică amploare prin fenomenul driftului genetic, infecția gripală nu se poate eradica.

Paramixovirusuri

Familia *Paramyxoviridae* cuprinde virusuri al căror genom este o catenă unitară de ARN, de polaritate negativă. Nucleocapsida are o simetrie helicală și este acoperită de peplos. Infectează numai organismele cu sânge cald și sunt reprezentate de patru genuri: *Paramyxovirus, Morbilivirus, Rubulavirus, Pneumovirus*.

Virionul este alcătuit din două module structurale: o regiune centrală ribonucleoproteică, în care se găsește genomul ARN monocatenar, asociat cu câteva tipuri de proteine, formând împreună *nucleocapsida*; *un înveliș lipoproteic* extern (peplos), derivat din membrana citoplasmatică a celulei.

Virionii au diametrul cuprins între 150-250 nm, dar în preparatul viral se găsesc și particule sferice mai mari (până la 400 nm), pleomorfe sau filamentoase. Variațiile dimensionale reflectă absența relativă a controlului morfogenezei virale în stadiul de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

înmugurire. Virionii mari pot să conţină doi sau mai mulţi echivalenţi genomici. Formele filamentoase rezultă prin ruperea învelişului viral şi despiralizarea nucleocapsidei.

Virusurile cu genom ARN monocatenar de polaritate negativă (*Mononegavirales*: *Paramyxoviridae, Rhabdoviridae* şi *Filoviridae*) au o trăsatură morfologică generală şi anume aspectul scămos al suprafeţei, datorat prezenţei spiculilor glicoproteici care mediază ataşarea şi pătrunderea lor în celulă.

Nucleocapsida are o simetrie helicală, dar aspectul sferic al virionilor derivă din faptul că în nucleocapsidă, capsomerele realizează interacţiuni laxe, ceea ce permite un grad ridicat de flexibilitate a acesteia. Fiecare unitate de structură a nucleocapsidei este flexibilă. Polipeptidul fiecărei capsomere are două domenii: N-terminal, ce cuprinde 2/3 ale moleculei, care are raporturi directe cu ARN genomic; domeniul C-terminal, orientat spre suprafaţa nucleocapsidei. Zona de joncţiune a celor două domenii, sensibilă la proteaze funcţionează ca o "articulaţie'(balama), la nivelul căreia molecula se deformează şi dobândeşte o altă configuraţie spaţială. Datorită flexibilităţii fiecărei capsomere, nucleocapsida se împachetează în interiorul învelişului. ARN împachetat strâns, datorită flexibilităţii capsomerelor, trebuie să rămână accesibil polimerazelor virionului, care transcriu catena de polaritate negativă în mesagerii complementari, înainte de dezagregarea capsidei.

Reprezentanţii acestei familii, prin intermediul *glicoproteinelor de înveliş*, la contactul cu eritrocitele de mamifere şi păsări, manifestă activitate hemaglutinantă şi neuraminidazică (g. *Paramyxovirus*), numai activitate hemaglutinantă (g. *Morbilivirus*) ori sunt lipsiţi de ambele tipuri de activitate (g. *Pneumovirus*). Glicoproteinele de înveliş mediază ataşarea virionilor de celulele sensibile.

Hemaglutinina este o glicoproteină cu orientare membranară de tip II. Capătul $-NH_2$ este ancorat în citoplasma celulei, iar capătul C-terminal se extinde în spaţiul extracelular. Are o mare afinitate pentru acidul sialic din glicoproteinele membranei celulare. Ataşarea virionilor pe eritrocite produce hemaglutinarea. Aceiaşi proteină poate avea şi activitate neuraminidazică şi de aceea se numeşte *hemaglutinin-neuraminidază(HN).*

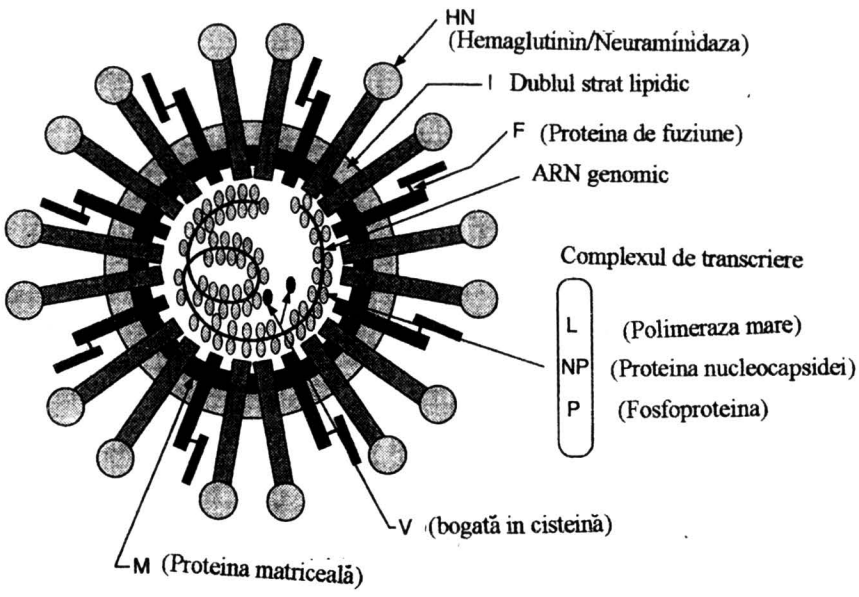


Fig. 137. Diagrama structurii unui paramixovirus. Nucleocapsida este alcătuită din ARN genomic şi nucleoproteina principală (NP), cărora li se adaugă polimerazele L (Large) şi P (Fosfoprtoeina). Cele trei proteine asociate cu ARN genomic formează complexul de transcriere - o ARN polimerază dependentă de ARN. Proteina matriceală (M) acoperă nucleocapsida. În peplos sunt inclavate spiculele de hemaglutinin-neuraminidază (HN) şi cele ale proteinei de fuziune (F). Proteina HN este alcătuită dintr-un peduncul şi o regiune globulară, iar proteina F constă din două subunităţi - F_1 şi F_2 - legate prin punţi S-S. La rubulavirusuri, în virion se găseşte proteina V, bogată în cisteină, dar la celelalte paramixovirusuri proteina V este nestructurală (după Lamb şi colab., 1996).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Nucleoproteina (NP) sau proteina N este proteina structurală majoră a virionului şi are rol esenţial în procesul asamblării.

Proteina de fuziune (F) are rolul de a media fuziunea învelişului lipoproteic viral, cu suprafaţa lipoproteică a membranei celulare în procesul infecţiei. Se găseşte pe suprafaţa virionilor tuturor reprezentanţilor familiei. Se sintetizează ca o proteină precursoare (F_o), dar ulterior este clivată în două subunităţi – F_1 (mai mare) şi F_2 – ce rămân legate prin punţi S-S. Pentru ca învelişul viral să fuzioneze cu membrana citoplasmatică, este necesară cooperarea HN şi a proteinei F. După ce interacţionează cu receptorul celular, proteina H îşi schimbă configuraţia şi expune peptidul F. Concomitent cu fuziunea, nucleocapsida virală este eliberată în citoplasmă.

Suprafaţa internă a învelişului este tapetată cu o proteină neglicozilată, *proteina M* (matriceală), cu rol în recunoaşterea specifică între proteina N a nucleocapsidei şi glicoproteinele de înveliş, în procesul asamblării.

Transcrierea ARN

Toate stadiile replicării virale se desfăşoară în citoplasmă, deoarece virionul conţine polimerazele ce catalizează transcrierea şi replicarea ARN genomic: proteinele *L* (*L*arge) şi *P*, ambele cu funcţie polimerazică. ARN-polimerazele virale dependente de ARN iniţiază transcrierea în citoplasmă, fără să necesite primeri exogeni, bonetează capătul 5' şi poliadenilează capătul 3' al ARNm monocistronici. Fiind monocistronici, mesagerii au totdeauna dimensiuni mai mici decât ARN genomic. ARN-polimeraza iniţiază sinteza mesagerilor la capătul 3'. Transcrierea se opreşte şi se reiniţiază la fiecare joncţiune genică. Reiniţierea transcrierii este mai puţin eficientă, adică numărul complexelor polimerazice care reiau transcrierea la sfârşitul fiecărui cistron, scade progresiv. De aceea, numărul moleculelor de ARNm transcrise dintr-un cistron este proporţional cu poziţia sa faţă de capătul 3' al genomului.

Membrii subfamiliei *Paramyxovirinae* au mecanisme particulare de diversificare a proteinelor codificate, fără să mărească dimensiunile genomului:

- ribosomii iniţiază traducerea la situsuri diferite ale unui cadru de citire;
- prin ARN "editing", proces care constă în adăugarea nucleotidelor fără matriţă. Prin acest mecanism, bazele (în special G) sunt încorporate fără matriţă, în molecula de ARN, în timpul transcrierii, diversificând copiile şi produsele lor.

Replicarea ARN

Pentru replicarea ARN trebuie conservată întreaga secvenţă de baze a ARN genomic, de polaritate negativă. Secvenţele care nu sunt exprimate în ARNm trebuie să fie menţinute în copiile antigenomice de ARN, care la rândul lor au rol de matriţă intermediară pentru sinteza moleculelor genomice de polaritate negativă. Replicarea ARN genomic este importantă în ciclul replicării, deoarece furnizează nu numai genomul virionilor progeni, ci şi matriţe multiple pentru transcriere, ceea ce determină o creştere logaritmică a tipurilor de macromolecule specific virale.

Mecanismul comutării de la sinteza ARNm (transcriere), la sinteza replicativă a ARN antigenomic pare a fi condiţionat de cantitatea de nucleoproteină (proteina N) disponibilă. Proteina N are rol esenţial în replicarea genomului şi în asamblarea vironilor. Ea se asociază atât cu catenele genomice, cât şi cu cele antigenomice.

Traducerea mesagerilor are ca rezultat, acumularea proteinelor virale (în special a proteinei N) şi comutarea de la transcriere (sinteza mesagerilor), la sinteza copiilor antigenomice. În prezenţa unei concentraţii crescute de nucleoproteină, polimeraza iniţiază sinteza ARN, dar ignoră toate semnalele reglatoare ale transcrierii şi sintetizează catene complementare ale genomului viral (catene antigenomice). Astfel, disponibilitatea proteinei N constituie probabil, principalul factor reglator al comutării sintezei de la mesageri, la copiile antigenomice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Asamblarea şi eliberarea virionilor. Ciclul de replicare a paramixovirusurilor este citoplasmatic. Nucleocapsidele se asamblează în două etape:

a) asocierea nucleoproteinei cu ARN genomic, pentru a forma ribonucleoproteina helicală;

b) asocierea proteinelor auxiliare ale nucleocapsidei.

Asamblarea învelişului viral se face la suprafaţa celulei. Situsurile membranare la nivelul cărora are loc înmugurirea trebuie pregătite în acest scop. Proteinele virale de înveliş, glicozilate la nivelul cisternelor reticulului endoplasmic şi a aparatului Golgi înlocuiesc glicoproteinele celulare inserate în stratul lipidic al membranei plasmatice. Glicoproteinele virale sunt orientate spre suprafaţa apicală a celulelor endoteliale *in vitro*, dar pentru alte virusuri învelite, glicoproteinele sunt orientate spre suprafaţa bazală. Ulterior, proteina M se agregă pe faţa internă a învelişului nascent, prin interacţiuni necovalente. Nucleocapsida recunoaşte proteina M şi la nivelul acestor situsuri are loc înmugurirea din membrana citoplasmatică.

Rhabdovirusuri

Caracteristica definitorie a virionilor este forma alungită, de glonţ (*rhabdos*, grec = baston). Reprezentanţii familiei *Rhabdoviridae* au cea mai largă răspândire în natură. S-au identificat peste 100 de variante virale, care infectează vertebratele (mamifere, reptile, peşti), crustaceele, plantele. Virusurile de importanţă clinică (agentul rabiei) şi economică (produc pierderi importante în piscicultură), infectează numai vertebratele. In general, rhabdovirusurile au un spectru larg de gazdă, unele fiind infecţioase atât pentru plante cât şi pentru artropodele care le transmit. S-au identificat peste 70 de rhabdovirusuri infecţioase pentru vertebrate. Numărul celor infecţioase pentru plante, pare a fi de ordinul sutelor, dar puţine dintre ele au fost identificate.

Cel mai adesea, rhabdovirusurile sunt transmise de artropode. Artropodele constituie rezervorul originar, din care s-au adaptat virusurile infecţioase pentru plante şi pentru vertebrate. Unele au cicluri mixte (artropod-plantă sau artropod-mamifer), ceea ce argumentează că la origine, aceste virusuri au fost infecţioase pentru artropode.

Rhabdovirusurile au fost clasificate în două genuri: g. *Vesiculovirus*, cu reprezentantul tipic al familiei – virusul stomatitei veziculare (VSV) şi g. *Lyssavirus*, care include virusul rabic şi pe cele asemănătoare. Prototipul acestei familii este VSV, iar virusul rabic prezintă caractere structurale şi funcţionale asemănătoare.

Forma de glonţ a virionilor este caracteristică rhabdovirusurilor. Lungimea este variată, între 100 şi 430 nm, iar diametrul în secţiune, între 50-100 nm, cu excepţia unor virusuri ale plantelor, cu aspect baciliform. In preparatele virale, apar frecvent *virioni defectivi*, cu acelaşi diametru, dar lungimea este de numai 25-50% din cea

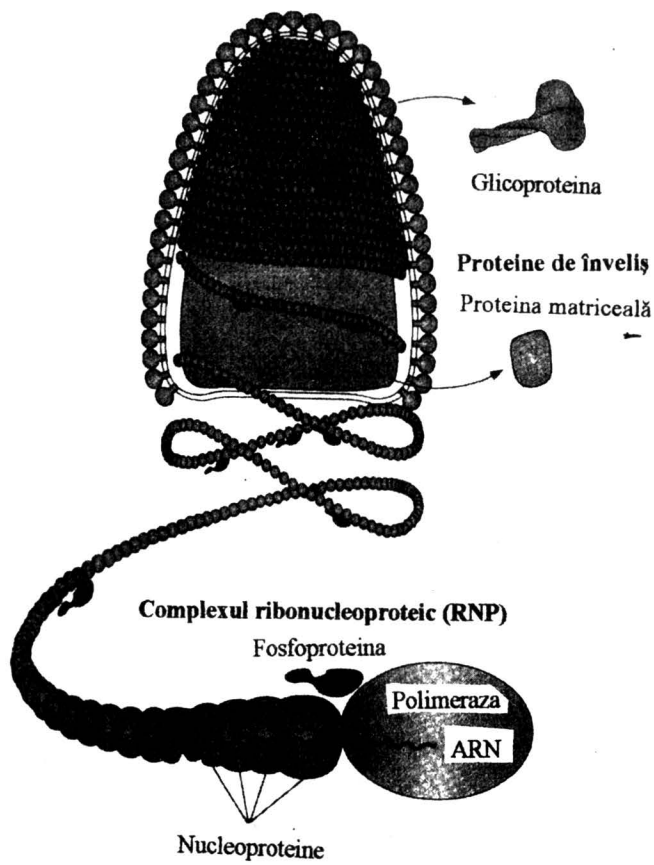


Fig. 138. Componentele virionului rabic (după Tordo, 1998).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

normală. Compoziţia chimică a particulelor defective este aceiaşi, dar nu sunt infecţioase, deoarece genomul lor este cu 50-80% mai mic decât cel normal.

Structura. Virionul este alcătuit din două componente structurale majore: a)nucleocapsida ribonucleoproteică, formată prin asocierea intimă a nucleoproteinei şi a ARN genomic, ce constituie regiunea centrală; b)învelişul, reprezentat de un dublu strat lipoproteic, care acoperă nucleocapsida. Pe suprafaţa virionului, proemină spiculele glicoproteice, acilate cu acid palmitic.

Genomul rhabdovirusurilor este o moleculă de ARN monocatenar nesegmentat, cu polaritate negativă, adică nu funcţionează ca ARNm, ci este transcris de ARN-polimerază în ARNm. ARN genomic este asociat cu nucleoproteina şi cu alte două proteine, minore din punct de vedere cantitativ: *fosfoproteina* şi *ARN-polimeraza L.*

In alcătuirea învelişului viral, se găsesc proteine şi lipide, în proporţii egale. Lipidele derivă în totalitate din membrana celulară, dar sunt selectate în alte proporţii decât cele din membrana plasmatică. Diferenţa principală constă în proporţia mai mare de colesterol. Raportul cantitativ modificat al diferitelor categorii de lipide, conferă vâscozitate semnificativ crescută peplosului virionilor, comparativ cu a membranei celulare.

Asociate învelişului viral, se găsesc două categorii de proteine: *o glicoproteină* integrată, orientată spre exterior, cu activitate hemaglutinantă şi *proteina matriceală (M)*, ce tapetează suprafaţa internă a învelişului.

Replicarea virală este întru-totul asemănătoare cu aceea a paramixovirusurilor. Citotropismul rhabdovirusurilor depinde, atât de existenţa receptorului celular de suprafaţă, cât şi de condiţiile mediului intracelular pentru replicare. Receptorul celular pentru virusul rabic este receptorul pentru nicotin-acetilcolină, dar virusul infectează şi celule care nu au un astfel de receptor.

După legarea de receptor, virusul este internalizat în *endosom.* Scăderea valorii pH în endosom, determină fuziunea acestuia cu peplosul viral şi astfel ribonucleoproteina virală este eliberată în citoplasmă. Fuziunea este consecinţa modificării conformaţionale a spiculelor glicoproteice inclavate în peplos.

Genomul rhabdovirusurilor are polaritate negativă şi trebuie transcris în ARNm. Complexul ribonucleoproteic are rol de matriţă, atât pentru transcrierea ARNm cât şi pentru sinteza replicativă a ARN. Ambele activităţi sunt catalizate de ARN-polimeraza virală. Enzima recunoaşte acelaşi promotor la capătul 3' al genomului complexat cu nucleoproteina şi progresează spre capătul 5'. Diferenţa dintre transcriere şi replicare este determinată de modul în care polimeraza progresează pe matriţa ribonucleoproteică: secvenţial sau continuu. Transcrierea este secvenţială şi produce copii monocistronice de ARNm, ce codifică proteinele virale. Progresia secvenţială depinde de recunoaşterea unor semnale scurte de start şi stop, care delimitează cistronii. După fiecare semnal stop, transcrierea este reluată cu o rată mai scazută, de la semnalul *start* al cistronului următor. Rata transcrierii scade progresiv faţă de punctul de iniţiere.

In contrast cu transcrierea, activitatea de replicază a polimerazei progresează continuu, fără semnale de stop şi generează o catenă antigenomică, cu polaritate pozitivă, de lungimea catenei genomice. Această catenă are rol de matriţă pentru sinteza catenelor genomice, cu polaritate negativă.

Pentru a deveni matriţe funcţionale, catenele genomică şi antigenomică trebuie complexate cu nucleoproteina, pentru a fi protejate de acţiunea nucleazei. De aceea, sinteza nucleoproteinei este necesară, atât pentru transcriere, cât şi pentru replicare.

Comutarea de la transcriere la replicare este condiţionată de cantitatea de nucleoproteină. Nivelul scazut al nucleoproteinei orientează activitatea ARN-polimerazei în sensul transcrierii ARNm, consecinţă a activării semnalelor de start şi de stop, care delimitează fiecare cistron.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

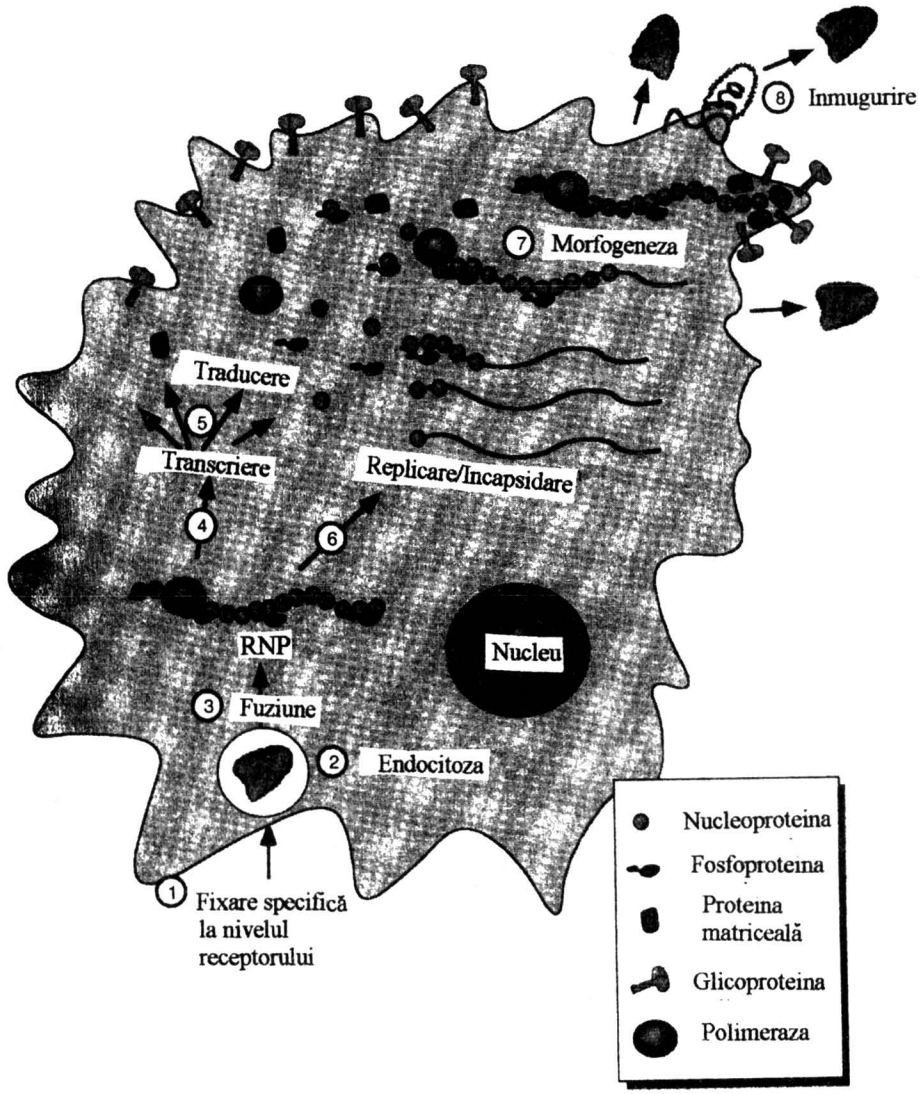


Fig. 139. Ciclul infecţios al virusului rabic (după Tordo, 1998).

Creşterea cantităţii de nucleoproteină, ca rezultat al traducerii mesagerilor săi, induce inactivarea semnalelor de stop şi start şi astfel, comutarea la copierea continuă a matriţei. În esenţă, ARN-polimeraza nu mai recunoaşte semnalele cistronice de start şi stop.

Proteinele virale se sintetizează în citosol, pe polisomii liberi, cu excepţia glicoproteinei de înveliş, care se sintetizează ca o proteină trasmembranară, pe polisomii asociaţi reticulului endoplasmic granular. Moleculele sale sunt transferate pe calea cisternelor Golgi, la nivelul unor situsuri membranare speciale.

Genomul viral se asociază cu nucleoproteina, formând complexul ribonucleoproteic, care se condensează şi se spiralizează. Nucleocapsidele înmuguresc la nivelul situsurilor membranare în care s-au inclavat spiculele glicoproteice.

Majoritatea rhabdovirusurilor înmuguresc prin membrana plasmatică, dar unele se asamblează prin înmugurire la nivelul membranelor celulare interne. Cele care înmuguresc din membranele reticulului endoplasmic (citorhabdovirusuri) sau din membrana nucleară (nucleorhabdovirusuri), se acumulează în spaţiul perinuclear.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Structura şi replicarea virusurilor cu simetrie icozaedrică

Picornavirusuri

Picornavirusurile sunt printre cele mai mici virusuri cu genom ARN (pico = lo^{-12}, unitate de măsură foarte mică). Virionii sunt sferici, nuzi (fără înveliş lipidic), cu diametrul de 24-30 nm). Capsida este alcătuită din 60 de subunităţi identice, aşezate după modelul simetriei icozaedrice.

Genomul este o moleculă de ARN monocatenar, de polaritate pozitivă (funcţionează ca ARNm), cu o lungime desfăşurată de 2500 nm. ARN este poliadenilat la capătul 3', cu o secvenţă de lungime variabilă. La capătul 5', este legată covalent, *proteina genomică* (VPg = proteina genomică a virionului), cu rol de iniţiere a sintezei ARN, având *rol de primer*, dar şi în procesul împachetării ARN în virion.

ARN genomic este tradus ca un mesaj unitar (monocistronic) şi se sintetizează o poliproteină de circa 2200 aminoacizi. Regiunea genomică codificatoare a poliproteinei, este flancată la fiecare capăt de secvenţele *netraduse (ntr)*. Poliproteina se clivează chiar în timpul traducerii (înainte de terminarea sintezei), astfel că o poliproteină de lungime reală nu se detectează. O cascadă de fenomene de clivare, catalizate de trei proteaze codificate de genomul viral, generează 11 produse finale (chiar 12, pentru virusurile care codifică proteina leader). Cele mai multe clivări ale poliproteinei le catalizează proteaza 3C, sau precursorul ei, 3CD. Proteina 3B este chiar VPg, iar 3D este ARN-polimeraza.

Proteinele 1A, 1B, 1C şi 1D formează un *protomer*. Protomerul este cea mai mică parte a unui *oligomer*, format din subunităţi identice. Oligomerul este echivalentul structural al unei *capsomere*.

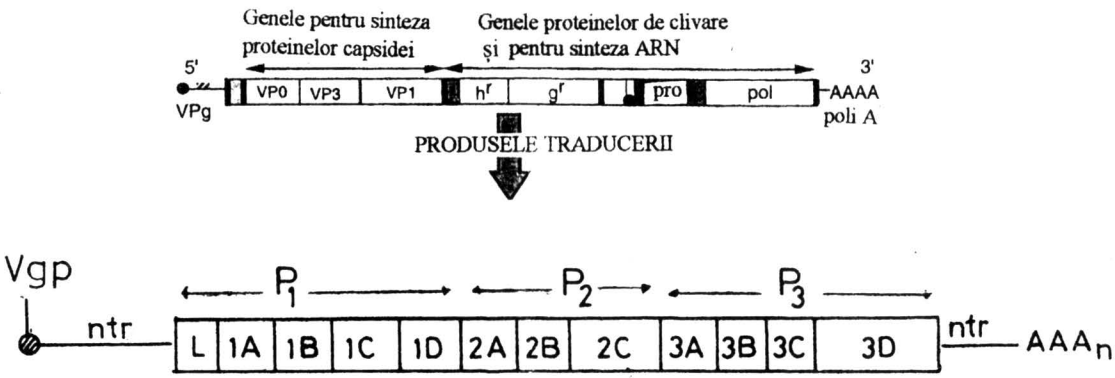


Fig. 140. Organizarea funcţională a genomului la picornavirusuri. Este ilustrată ordinea genelor care codifică poliproteina virală. Sinteza sa se face de la capătul N spre capătul C-terminal. Genele codificatoare ale proteinei capsidale sunt localizate în jumătatea dreaptă a genomului. ARN este organizat în succesiunea 5'-VPg (glicoproteina virală) - ntr (secvenţa netradusă) - poliproteina - ntr - poli A. ntr. semnifică secvenţele netraduse care flanchează poliproteina. Secvenţa L(Leader) codifică proteina coresponzătoare a unor picornavirusuri. P_1, P_2, P_3, sunt proteinele precursoare clivate de proteazele codificate de virus în 4,3 şi respectiv 4 produse finale. g^r = gena markerului de rezistenţă la guanidină. Gena h^r este implicată în sinteza ARN. Clivajul poliproteinei este catalizat de trei proteaze de virus (2A sau 2AB şi 3C sau 3DC). Clivajul VP_0 în VP_4 şI VP_2 are loc numai după ce ARN a fost împachetat în capsidă (după Rueckert, 1996).

Ciclul de multiplicare

Prima etapă a interacţiunii cu celulele sensibile este adsorbţia virionilor pe suprafaţa celulei, mediată de receptorii celulari. Receptorii de poliovirus nu sunt identificaţi, dar conţin acid sialic, deoarece sunt inactivaţi de neuraminidază şi sunt sensibili la acţiunea tripsinei. Moleculele receptoare de virus au rol în legarea factorilor de creştere, iar altele sunt molecule din categoria integrinelor, având rol de aderenţa intercelulară.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Poliovirusul infectează celulele epiteliale ale nazofaringelui şi ale intestinului uman. ciclul infecţios care se desfăşoară în aceste celule asigură perpetuarea sa în natură. Forma paralitică a infecţiei este consecinţa unei specificităţi foarte înalte a virusului pentru neuronii din coloanele anterioare ale măduvei spinării. Tropismul celular se explică parţial, prin existenţa moleculelor receptoare specifice, implicate în legarea virusului. Existenţa receptorilor nu explică în totalitate tropismul, deoarece sunt numeroase situaţii de infecţie abortivă, în care infecţia este iniţiată (virionul este internalizat şi genomul este dezvelit), dar este stopată într-o etapă a ciclului de replicare, ceea ce sugerează existenţa unor factori celulari cu rol specific pentru sinteza macromoleculelor esenţiale ale ciclului de multiplicare virală (ARN, proteine).

Virionii sunt încorporaţi în celulă prin *viropexie* (endocitoza mediată de receptori). Pe la vârfurile icozaedrului, capsomerele pentagonale pierd una din cele patru proteine (VP_4) şi ARN este eliberat în celulă. ARN genomic este tradus în poliproteina clivată în P_1, P_2, P_3.

Replicarea ARN se realizează prin intermediul unei structuri denumită *intermediar de replicare*. Catena genomică de polaritate pozitivă are rol de matriţă pentru sinteza catenei de polaritate negativă. In molecula dublu catenară, catena de polaritate negativă are rol de matriţă pentru sinteza ARNm şi a ARN genomic. Aparatul enzimatic este acelaşi pentru sinteza ambelor categorii de ARN. Din totalul ARN viral sintetizat în celula infectată, ARN de polaritate negativă, reprezintă 5-10%, restul fiind catene de polaritate pozitivă. Din totalul catenelor de polaritate pozitivă, circa jumătate funcţionează ca ARNm, iar restul este împachetat în virioni ca ARN genomic.

Virusul codifică sinteza propriilor enzime de replicare genomică. Nu necesită participarea funcţiilor nucleare, deoarece se multiplică în celulele enucleate. Independenţa replicării ARN genomic, de sinteza acizilor nucleici celulari, rezultă din studiile cu inhibitori metabolici. Inhibitorii sintezei ADN (5-bromouracilul, 5-fluorodeoxiuridina) nu inhibă multiplicarea virusului. Actinomicina D inhibă sinteza ADN celular, deoarece se intercalează între bazele ADN dublu catenar, dar inhibă, într-o măsură limitată, multiplicarea poliovirusului.

Asamblarea picornavirusurilor este un proces spontan (autoasamblare) şi este determinată de concentraţia locală a componentelor virale, în imediata vecinătate a membranei citoplasmatice. Fiind un proces de autoasamblare, nu necesită prezenţa unor factori catalizatori. Asamblarea decurge în următoarele stadii:

- poliproteina P_1, rezultată din precursorii proteinelor structurale, se asociază în ansambluri pentamerice şi formează *capsomere*;
- 12 astfel de ansambluri pentamerice formează o *precapsidă* şi la exteriorul ei se asociază ARN genomic;
- în etapa a III-a are loc clivarea proteinei P_1 în VP_0, VP_1, şi VP_3;
- în etapa a IV-a se produce clivarea finală şi rezultă VP_1, VP_2, VP_3 şi VP_4, concomitent cu internalizarea genomului.

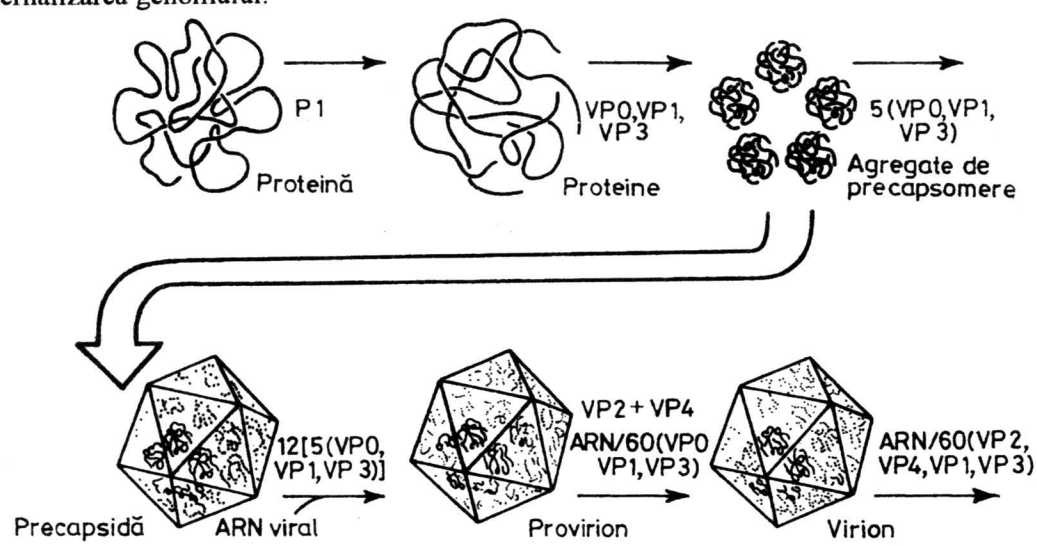


Fig. 141. Etapele intermediare ale morfogenezei virusului *Polio* şi moleculele care participă la formarea precapsomerelor, precapsidei, provirionului şi virionului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Capsida este formată din 60 de capsomere. Fiecare din cele 12 ansambluri pentamerice furnizează prin clivare, 5 capsomere. Fiecare capsomeră este alcătuită din cele patru proteine. Unele capside rămân goale.

Impachetarea genomului rămâne o problemă esenţială a morfogenezei picornavirusurilor. Genomul ARN se înfăşoară în jurul precapsidei şi induce modificarea conformaţiei proteinelor.

Timpul necesar pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare, de la infecţie până la asamblarea virionilor este de 5-10 ore. Randamentul infecţiei este de 25-100 000 virioni/celulă.

Studiul replicării picornavirusurilor a stat la baza a trei descoperiri importante:

- demonstrarea existenţei unei ARN-polimeraze dependentă de ARN, de origine virală;
- identificarea unei forme replicative dublu catenare a ARN viral;
- descoperirea faptului ca poliovirusul sintetizează produsele genice prin clivarea proteolitică a unei poliproteine mari, ceea ce constituie o diferenţă majoră a traducerii, între virusuri şi celule.

Adenovirusuri

Denumirea de "adenovirusuri" îşi are originea în faptul ca reprezentanţii grupului s-au izolat iniţial, din culturile de ţesut amigdalian (tonsile) şi din ţesuturile adenoide umane (Rowe, 1953).

Adenovirusurile sunt nude, de formă sferică, cu diametrul de 65-80 nm. Capsida are simetrie icozaedrică şi este alcătuită din 252 capsomere: 240 de formă hexagonală (hexoni) şi 12 de formă pentagonală (pentoni), aşezate câte una la fiecare din cele 12 vârfuri ale icozaedrului. La fiecare vârf proemină câte o structură filamentoasă, denumită *fibră*, cu lungimi diferite de la un serotip la altul. Hexonii şi pentonii sunt formaţi din proteine diferite.

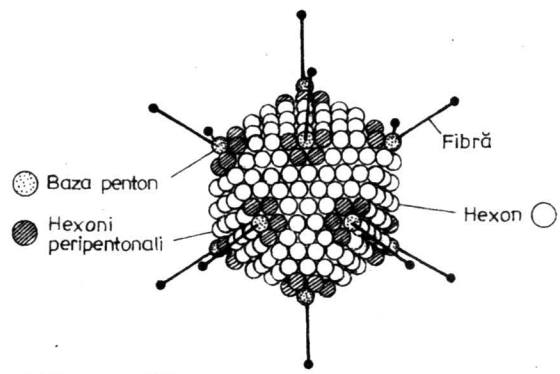


Fig. 142. Modelul distribuţiei capsomerelor în capsida unui adenovirus. Cei 12 pentoni sunt aşezaţi la vârfurile icozaedrului.

Virionii conţin ADN (13%) şi proteine (87%). Nu conţin lipide şi sunt stabili în prezenţa eterului sau etanolului.

Virionii conţin cel puţin 12 tipuri de proteine structurale distincte. Ele intră în alcătuirea hexonilor (proteina II), a bazei pentonilor (proteina III), a fibrei pentonilor (proteina IV), proteina asociată bazei pentonilor (III a), proteine asociate hexonilor (VI, VIII, IX), proteine asociate ADN (V, VII, proteina de 55 kD) şi proteine asociate nanomerilor hexonici (X, XI, XII).

La electroforeză, după disocierea virionilor cu SDS (sodium dodecil sulfat), un detergent ionic puternic, s-au identificat 11-15 proteine.

Genomul adenovirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară şi prezintă particularitatea asocierii unui polipeptid de 55 kD legat covalent de dCMP, la fiecare capăt 5' al genomului linear. ADN are repetiţii terminale inversate, lungi de 100-140 perechi de baze, diferite de la un serotip la altul.

Capsomerele *hexonice* sunt trimere, fiind alcătuite din trei molecule proteice identice, asociate prin interacţiuni necovalente. Cele 240 de capsomere hexagonale, conţin 720 molecule identice. In asociaţie cu hexonii sunt alte trei tipuri de polipeptide (VI, VIII, IX).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

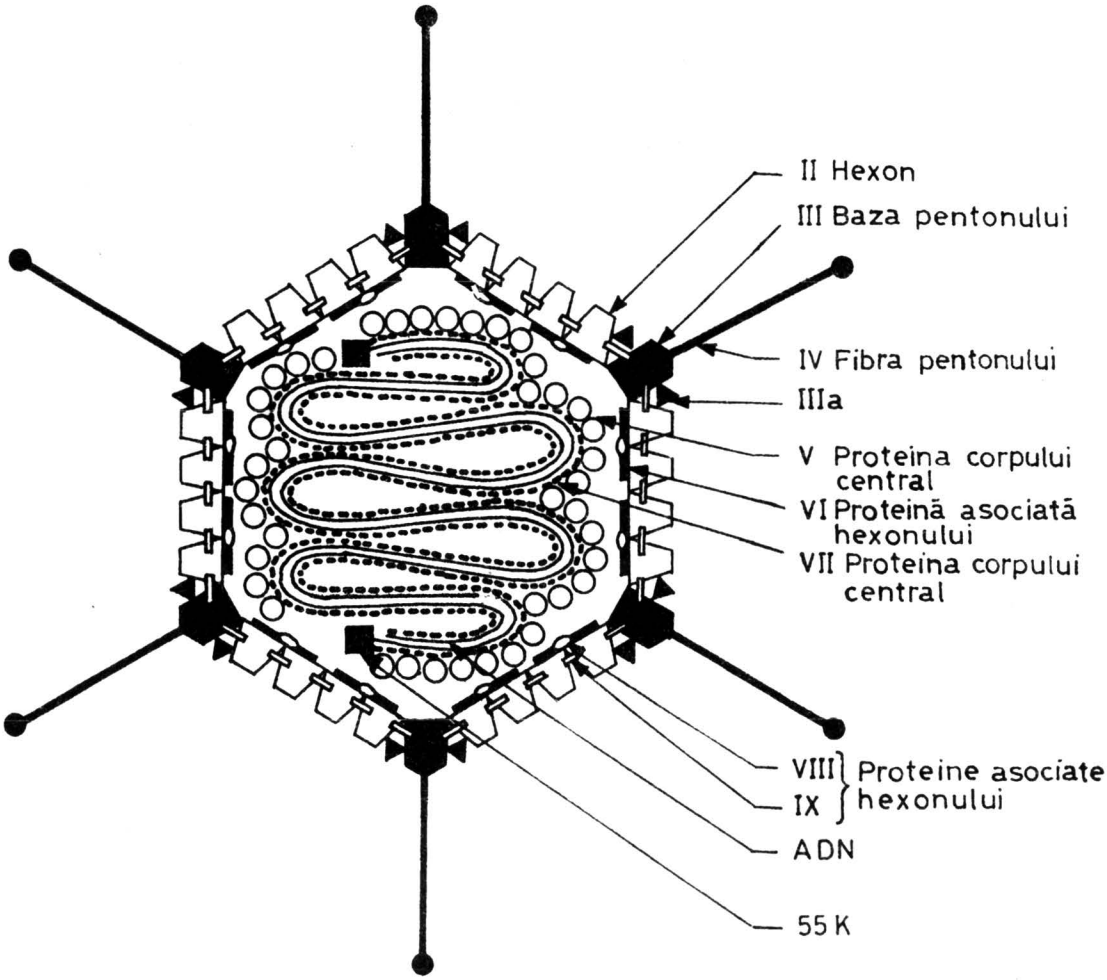


Fig. 143. Reprezentarea schematică a modelului de structură moleculară a unui adenovirus, cu topografia principalelor proteine ale virionului (după Harrison, 1991).

Capsomerele *pentonice* sunt formate din 5 monomeri identici ai proteinei III, ce formează *baza,* iar *fibra* legată de penton, este alcătuită din alte trei molecule proteice identice (proteina IV).

Adenovirusurile sunt foarte diferite din punct de vedere *antigenic*. Numai cele izolate de la om aparţin la 47 *serotipuri*. Toate serotipurile de adenovirusuri au un *antigen de grup, comun*, cu reactivitate încrucişată, situat pe suprafaţa internă a capsomerelor hexonice (proteinele asociate hexonilor).

Serotipurile se caracterizează prin capacitatea lor de a induce sinteza anticorpilor neutralizanţi specifici. Un serotip poate fi definit ca o variantă antigenică care este neutralizată de un antiser heterolog, decât cel mult până la diluţia de 1/16. Proteinele care conferă specificitate serologică pentru cele peste 40 de tipuri antigenice, sunt cele ce intră în alcătuirea hexonilor (proteina II) şi proteina constitutivă a fibrelor (IV).

Adenovirusurile codifică sinteza unor proteine nestructurale, adică a unor proteine care nu intră în alcătuirea virionilor, dar sunt detectabile în celula infectată.

Proteinele asociate ADN (V, VII, proteina de 55 kD) sunt bazice. Ele au rolul de a neutraliza grupările acide ale ADN, uşurând procesul de împachetare. Au conţinut ridicat de arginină, ca şi histonele celulare, dar spre deosebire de acestea nu conţin triptofan.

Pe baza prezenţei antigenelor cu specificitate de grup, adenovirusurile sunt clasificate în două genuri:

- *Mastadenovirus,* cu 9 grupe infecţioase pentru mamifere (bovin, canin, caprin, equin, uman, murin, ovin, porcin, simian);
- *Aviadenovirus*, cu 5 grupe infecţioase pentru păsări: raţă, găină, gâscă, fazan, curcă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ciclul de multiplicare

Majoritatea adenovirusurilor se multiplică în celulele liniilor HeLa sau KB. Pentru sincronizarea ciclului de replicare, substratul celular se infectează la multiplicitate foarte înaltă. Ciclul de replicare parcurge faze timpurii şi tardive, demarcate de momentul începerii replicării genomului viral. Distincţia dintre cele două faze nu este netă, deoarece unele tipuri de ARNm timpuriu se sintetizează şi în fazele tardive.

Câteva tipuri serologice (12, 18, 31) au capacitatea de a induce transformarea malignă a celulelor, *in vitro*.

Infecţia cu adenovirusuri are efecte profunde asupra sintezelor macromoleculare ale celulei. Este inhibată sinteza ADN şi a proteinelor. Cauza principală a blocării sintezei proteinelor este oprirea transportului ARNm celular spre citoplasmă, deşi în nucleu transcrierea ARNm este foarte activă. Inhibiţia sintezei proteinelor celulare este rapidă după infecţie, deşi ARNm celular este stabil. Stoparea rapidă a sintezei proteinelor specifice celulei sugerează existenţa unui mecanism de control al traducerii mesajelor, activ după infecţia virală.

Ciclul replicării virale durează 32-36 ore. In acest interval, celula infectată îşi dublează conţinutul de ADN şi proteine. Creşterea este aproape în întregime datorată sintezei macromoleculelor virale. In stadiile tardive ale replicării, proteinele se sintetizează în mare exces şi formează incluziuni nucleare cu structură de tip cristalin.

Virionul se ataşează de receptorul celular, prin intermediul fibrei pentonice. Anticorpii specifici anti-fibră, neutralizează infecţiozitatea virală. Acelaşi efect îl au anticorpii anti-hexoni peripentonali (baza pentonului se află în ambianţa a 5 hexoni). Virionul pătrunde în celulă prin *viropexie* (endocitoză mediată de receptori). In vezicula de endocitoză, pH scade la 5,5. După ruperea ei, virionul este eliberat în citoplasmă. Capsomerele pentonice (şi fibrele ataşate lor) se desprind din structura capsidei.

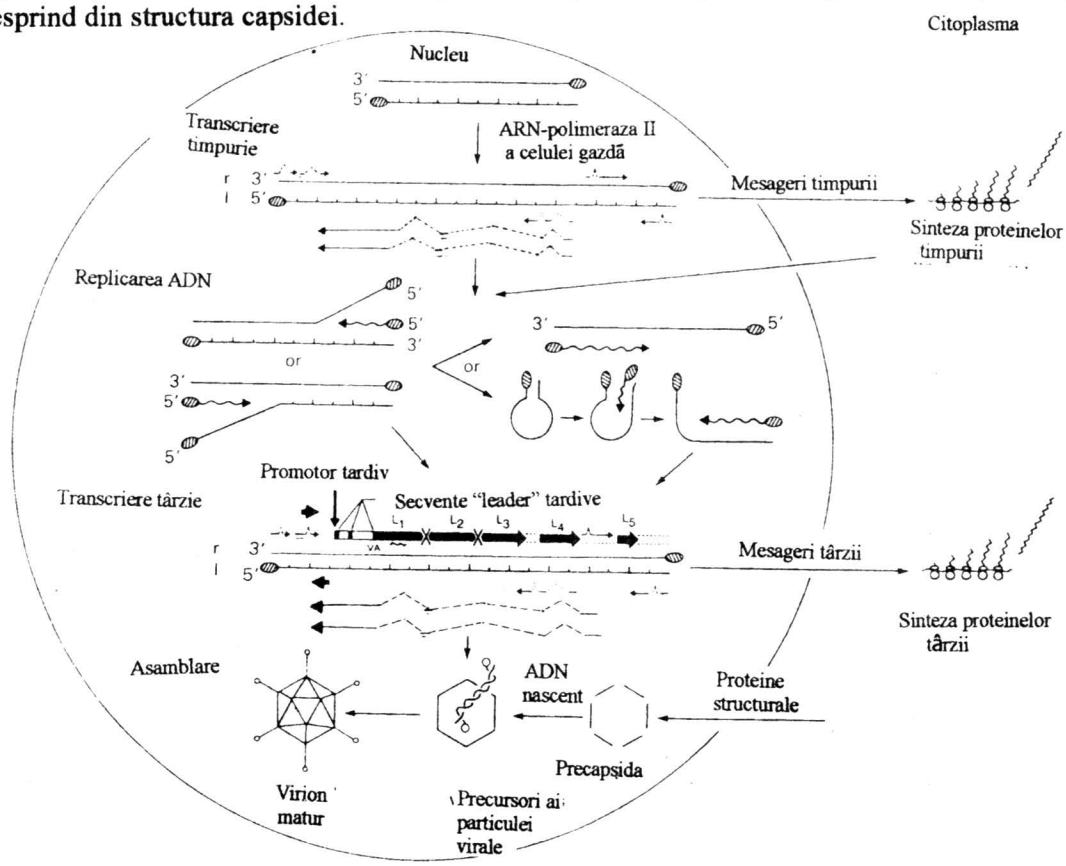


Fig. 144. Ciclul de replicare a adenovirusului 2. ARNm timpuriu, ca şi ARNm tardiv este transcris din 5 situsuri separate ale genomului, iar după transcriere este prelucrat prin eliminarea intronilor. Replicarea ADN se face după modelul semiconservativ asimetric. ADN monocatenar deplasat prin sinteza noii catene formează un intermediar circular, datorită secvenţelor terminale repetate invers. Proteina terminală de 80 kD asociată capătului 5′ are rol de primer pentru iniţierea sintezei ADN (după Davis, 1990).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virusul este transportat în citoplasmă, probabil prin sistemul microtubulilor. Colchicina, deşi interferă cu asamblarea microtubulilor nu inhibă multiplicarea virusului, dar vinblastina o stopează. Sub acţiunea vinblastinei, tubulina se agregă în structuri paracristaline perinucleare şi astfel particulele virale nu sunt transportate la sediul nuclear al dezvelirii şi multiplicării.

Virionul ajunge la porii nucleari. ADN asociat cu proteinele sale, pătrunde în nucleu. Majoritatea proteinelor virionului rămân în citoplasmă. ADN viral se complexează cu proteine histonice celulare şi formează un complex întru-totul asemănător cromatinei nucleare.

Transcrierea ARNm, atât timpurie cât şi tardivă este catalizată de ARN-polimeraza II celulară. Transcrierea este inhibată de alfa-amanitină, un inhibitor specific al acestei enzime.

ARN premesager viral este prelucrat de enzimele celulare prin clivare şi înădire. Fenomenul prelucrării ARN premesager a fost descoperit la adenovirusuri. ARNm este prelucrat prin clivare şi înădire alternativă, ceea ce face posibil ca aceiaşi secvenţă de baze să aibă rolul de *intron* pentru unele copii de ARNm şi de *exon* pentru altele. Inădirea alternativă amplifică potenţialul codificator al genomului adenovirusurilor. Genomul codifică sinteza a circa 40 de polipeptide diferite, dintre care 13 sunt structurale, iar restul sunt nestructurale şi au rol în replicarea ADN, rol reglator şi rol în morfogeneza virionilor.

Asamblarea virionilor se desfăşoară în nucleu. Este un proces complex care decurge în stadii succesive şi începe când polipeptidele se asamblează în capsomere, în citoplasmă. Proteina hexonică se sintetizează în 3-4 minute şi asamblarea, după sinteză, este rapidă. Asamblarea hexonilor este mediată de o proteină de "cofraj"(proteina necesară în timpul asamblării unei structuri, dar absentă în produsul final al asamblării).

Polipeptidele pentonice se sintetizează în 1,6 minute şi se asamblează după o cinetică bifazică: baza pentonică se asamblează din 5 molecule identice ale proteinei III, iar fibra pentonică, din trei molecule identice ale proteine IV.

Capsomerele sunt transportate în nucleu. Capsomerele hexonice se autoasamblează în capside goale, probabil prin formarea nanomerilor (grupe de câte 9 capsomere hexonice), ce ocupă toate cele 20 de feţe ale icozaedrului. Urmează câteva stadii succesive, în cursul cărora se asociază diferite proteine componente.

ADN nud pătrunde în capsidă, printr-o deschidere a unuia din vârfurile icozaedrului. In capsidă, ADN se asociază cu proteinele specifice şi se pliază.

Efectul multiplicării adenovirusurilor este liza celulei gazdă. Virionii progeni se eliberează după moartea şi dezintegrarea celulei.

Herpesvirusuri

Familia *Herpesviridae* reuneşte peste 100 de virusuri diferite, infecţioase pentru toate clasele de vertebrate. Ele au proprietăţi biologice particulare, legate de capacitatea de a produce infecţii care rămân *latente* pentru tot restul vieţii şi de a fi reactivate *periodic(recurente)*, producând leziuni la sau lângă situsul infecţiei iniţiale. Sunt bine adaptate la gazdele lor, adeseori infecţiile primare sau cele recurente fiind inaparente sau însoţite de manifestări clinice variate: herpesul labial, gingivo-stomatite, keratite, encefalite şi malformaţii congenitale (*Herpes simplex virus - HSV 1*) sau infecţii urogenitale (*Herpes simplex virus – HSV 2*). In regiunile temperate, virusul Epstein-Barr produce mononucleoza infecţioasă, iar în regiunile tropicale ale Africii este agentul limfomului Burkitt (tumoră a maxilarului, originară în limfocitele B)

Structura. Virionul este alcătuit din 4 elemente structurale:

- *regiunea centrală* electrono-densă, ce conţine genomul şi proteinele asociate ADN;
- *capsida proteică*, formată din 162 capsomere (150 hexoni şi 12 pentoni), aşezate după o simetrie icozaedrică. In alcătuirea capsidei intră 8 tipuri de proteine. Capsomerele au formă cilindrică şi sunt goale la interior. Atât hexonii cât şi pentonii sunt alcătuiţi din aceiaşi proteină;
- *tegumentul amorf*, reprezentat de spaţiul dintre înveliş şi suprafaţa capsidei, ce conţine cel puţin 20 de componente proteice;
- *învelişul extern*, în care se găsesc inclavaţi spiculii. Invelişul şi anexele sale conţin 10 proteine diferite, majoritatea glicozilate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

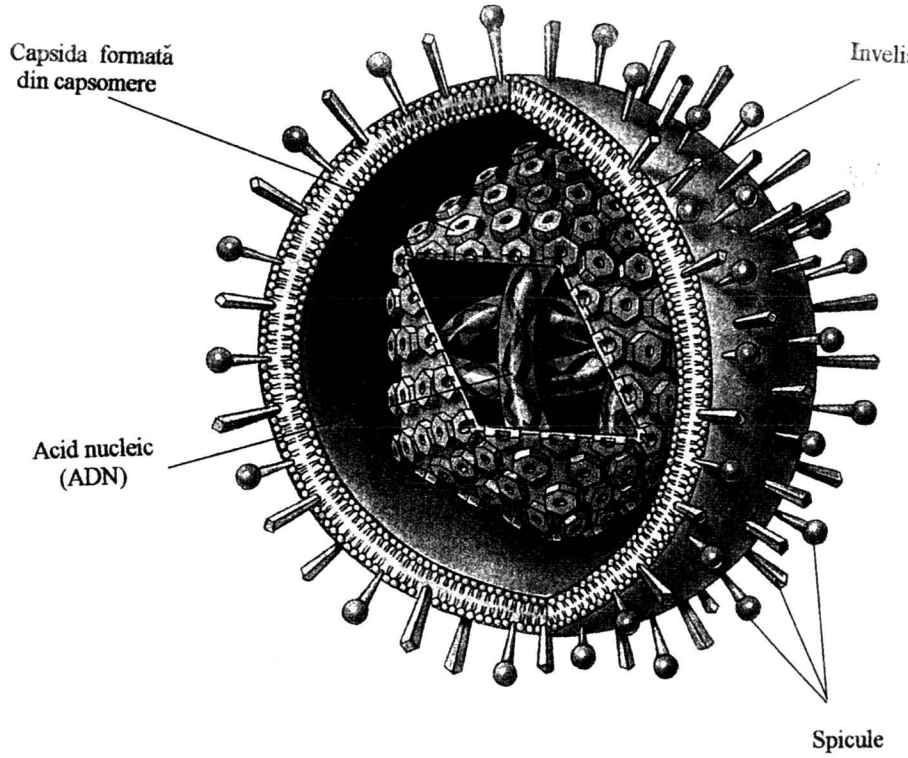


Fig. 145. Componentele structurale ale unui herpesvirus.

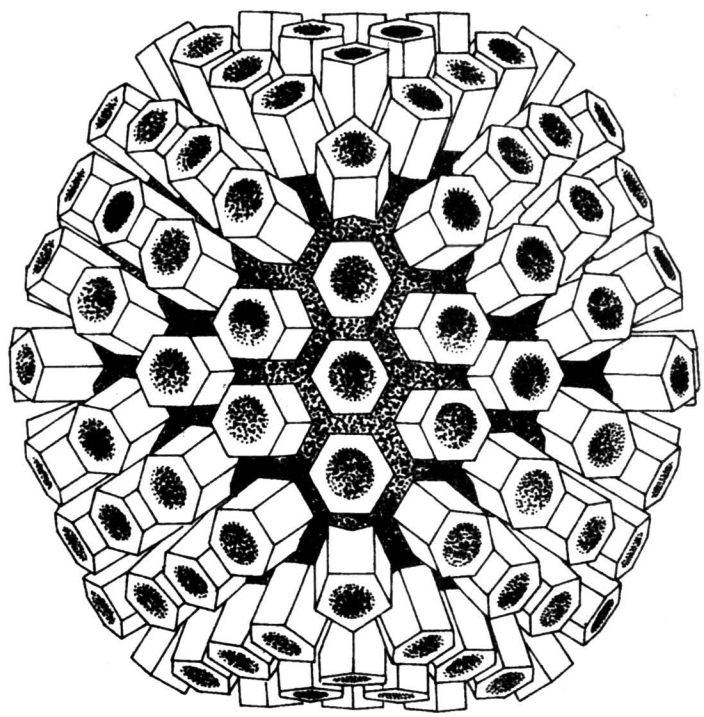


Fig. 146. Reprezentarea schematică a capsidei unui herpesvirus, văzută de-a lungul uneia din axele sale de simetrie de tip 2.

Toate proteinele structurale ale virionului sunt sintetizate în ciclul infecţios.
S-au descris trei tipuri de virioni:
a) virioni fără genom şi fără înveliş (capside goale);
b) virioni alcătuiţi din capsidă şi genom, dar fără înveliş;
c) virioni maturi, ce conţin toate componentele structurale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virusurile acestei familii au o morfologie unitară, dar se deosebesc prin proprietăţile biologice.

În funcţie de spectrul de gazdă, de durata ciclului de replicare, de efectele citopatice pe care le produc, herpesvirusurile au fost divizate în trei subfamilii; alfa-, beta- şi gamaherpesvirusuri.

Reprezentanţii subfamiliei *Alfaherpesvirinae* au un spectru de gazdă variat. Ciclul lor de multiplicare este scurt şi produc liza celulelor. Sunt neurotrope şi stabilesc infecţii latente, în special în ganglionii senzitivi (HSV 1, HSV 2, virusul varicella zoster - VZV).

Subfamilia *Betaherpesvirinae* cuprinde virusuri cu spectru îngust de gazdă, iar ciclul de replicare este lung. *In vitro*, frecvent, se stabileşte starea de purtător (virusul citomegalic – CMV şi virusurile herpetice umane 6 şi 7).

Reprezentanţii subfamiliei *Gamaherpesvirinae* produc maladii limfoproliferative la gazdele naturale. Sunt specifice pentru limfocitele T sau B, dar ciclul de multiplicare se blochează în mod frecvent şi infecţia devine latentă. Calificativul de "virusuri limfotrope" nu este adecvat, deoarece limfocitele sunt semipermisive.

Genomul herpesvirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, împachetată sub forma unui toroid, pe un ax proteic. Capetele moleculei sunt probabil, în strânsă proximitate, deoarece se circularizează rapid după ce ajunge în nucleul celulei infectate. Molecula conţine 125-140 kb şi prezintă secvenţe repetate în ordine inversată sau directă, la extremităţi sau la interior, care delimitează secvenţe codificatoare unice: *L* (*L*arge) şi *S* (*S*mall). Secvenţele unice *L* şi *S* se pot inversa una faţă de cealaltă şi produc patru izomeri lineari, notaţi cu *P* (Prototip), *IL* (inversia secvenţei L), *IS* (inversia secvenţei S) şi *ISL* (inversia ambelor secvenţe).

La unele herpesvirusuri, genomul constă dintr-o secvenţă unică, flancată de secvenţe repetate în ordine directă.

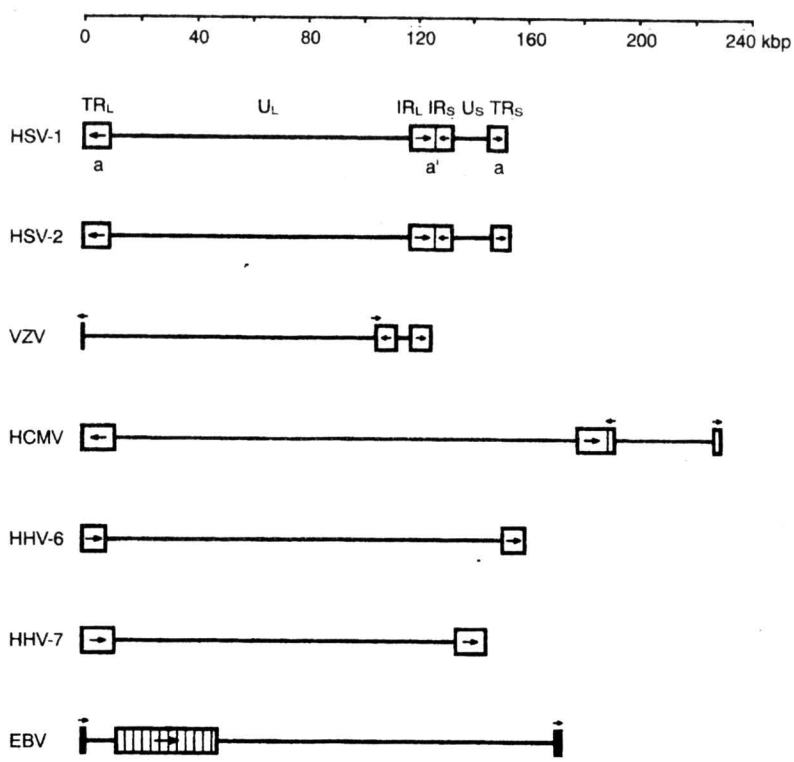


Fig. 147. Dimensiunile (în kb) şi structura genomului herpesvirusurilor umane. Secvenţele unice sunt reprezentate prin liniile simple, iar secvenţele repetate, prin dreptunghiuri. Săgeţile indică orientarea repetării bazelor. Denumirile pentru desemnarea diferitelor secvenţe ale genomului sunt utilizate pentru HSV-1. O secvenţă repetată direct la capetele genomului, dar prezentă şi la interior în ordine inversată este notată cu *a* şi respectiv *a'* (după Davison, 1998).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Numărul genelor identificate prin analiza de secvenţiere variază între 70 (la HSV 1) şi 200 (la CMV). Numărul mare de gene asigură desfăşurarea ciclului de replicare în condiţiile variate oferite de substratul celular. Totuşi, circa jumătate din genele HSV 1 par a fi neesenţiale, deoarece pot fi clivate fără să afecteze replicarea virusului în culturile celulare.

Virionul conţine poliamine – spermidina şi spermina - (40-70 000 molecule/virion), cu rolul de a neutraliza grupările acide ale ADN, creind astfel condiţii favorabile plierii moleculei de ADN în interiorul capsidei. Poliaminele par a fi strâns asociate moleculei de ADN.

Lipidele învelişului viral sunt dobândite în celula gazdă.

Ciclul de multiplicare

După ce virionii se leagă de receptori celulari (a căror structură chimică nu se cunoaşte), învelişul fuzionează cu membrana plasmatică. Nucleocapsida este transportată pe calea microtubulilor până la porii nucleari, la nivelul cărora ADN genomic este eliberat în nucleu.

Transcrierea, replicarea ADN şi asamblarea virionilor progeni se desfăşoară în nucleul celulei.

ADN viral este transcris în mesagerii specifici pe toată durata infecţiei productive, de ARN-polimeraza II celulară. Mesagerii sunt bonetaţi, metilaţi şi poliadenilaţi de enzime codificate de virus. O caracteristică a herpesvirusurilor, este aceea că ele codifică un număr mare de enzime implicate în sinteza ADN, dar numărul lor este mult mai mare.

Proteinele virale îndeplinesc funcţii specifice în ciclul de replicare. Complexitatea structurală şi genetică a acestor virusuri, impune acţiunea unor mecanisme reglatoare puţin înţelese. Genomul lor cuprinde un număr relativ mare de gene (câteva zeci), care sunt grupate funcţional, în raport cu momentul transcrierii. Genele virale sunt transcrise succesiv:

- primele sunt transcrise genele grupului *alfa*, în absenţa sintezei proteinelor virale;
- proteinele codificate de genele *alfa* activează genele *beta*;
- transcrierea genelor *gama* este dependentă de replicarea ADN.

Poteinele virale se sintetizează pe poliribosomii liberi şi asociaţi reticulului endoplasmic şi sunt prelucrate prin clivare, fosforilare, glicozilare şi sulfatare.

Replicarea ADN viral este catalizată de un număr mare de enzime virale. Marcajul în puls[x] arată că moleculelor replicate le lipsesc capetele libere, ceea ce semnifică faptul că ADN se replică prin intermediul unor molecule circulare sau al unor concatemeri lineari în conexiune cap-coadă. Altă dovadă că moleculele noi au dimensiuni mari, este adusă de experienţele cu precursori marcaţi: moleculele marcate sedimentează mult mai repede decât moleculele dublu-catenare de dimensiuni obişnuite.

La începutul intervalului de sinteză, în celula infectată se găsesc molecule lineare şi circulare de ADN viral. Cel puţin în faza tardivă a ciclului infecţios, ADN se replică după mecanismul "cercului rotativ" şi se formează concatemeri care sunt clivaţi în molecule de dimensiunea genomului, ce vor fi împachetate în capside.

Virusurile *Herpes simplex* codifică sinteza unui număr mare de proteine implicate atât în sinteza ADN, cât şi a dezoxiribonucleotidelor (de exemplu, timidin-kinaza, ribonucleotid-reductaza etc.), care nu par a fi esenţiale pentru multiplicarea virală, deoarece celula posedă astfel de enzime.

Timidin-kinaza are un spectru de activitate mai larg decât al enzimei omologe din celulă, deoarece fosforilează nu numai dezoxiprimidinele, ci şi purinele (adenina, guanina) legate de pentoze, precum şi o varietate de analogi ai nucleozidelor care nu sunt fosforilaţi eficient de kinazele celulare.

[x] Principiul metodologic al marcării în puls este următorul: proba biologică se incubă în "mediul cald"ce conţine un precursor radioactiv (timidina tritiată), un interval scurt de timp (fracţiuni de secundă), după care este transferată în "mediul rece".

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ribonucleotid-reductaza are rolul de a reduce ribonucleotidele la dezoxiribonucleotide, creind un substrat de rezervă pentru sinteza ADN. Enzima nu este necesară pentru multiplicarea virusului în celulele care se divid, deoarece enzima celulară suplineşte pe cea virală, dar este necesară pentru multiplicarea virusului în celulele care nu se divid, sau în cele menţinute la o temperatură la care ciclul de diviziune este stopat (39,5°).

Asamblarea capsidelor are loc în nucleu. ADN este clivat din concatemerii genomici şi este împachetat în capsidele preformate. Nu s-au identificat proteinele cu rol de clivare şi împachetare. Cele două procese sunt strâns legate. ADN este mai întâi împachetat şi apoi secţionat.

Învelirea virionilor are loc la nivelul membranelor nucleare. Semnul distinctiv al celulelor, în fazele târzii ale ciclului infecţios, este apariţia membranelor reduplicate (zone groase, concave sau convexe), mai ales în anvelopa nucleară. Invelişul viral se formează la nivelul acestor zone. Deoarece virionii nu conţin cantităţi detectabile de proteine membranare, este probabil că zonele îngroşate reprezintă agregări de proteine virale, cu următoarea distribuţie: a)glicoproteinele virale se localizează pe membrana externă; b)proteinele tegumentului se inseră în membrana internă. Nu se cunoaşte mecanismul încorporării lor în membranele nucleare.

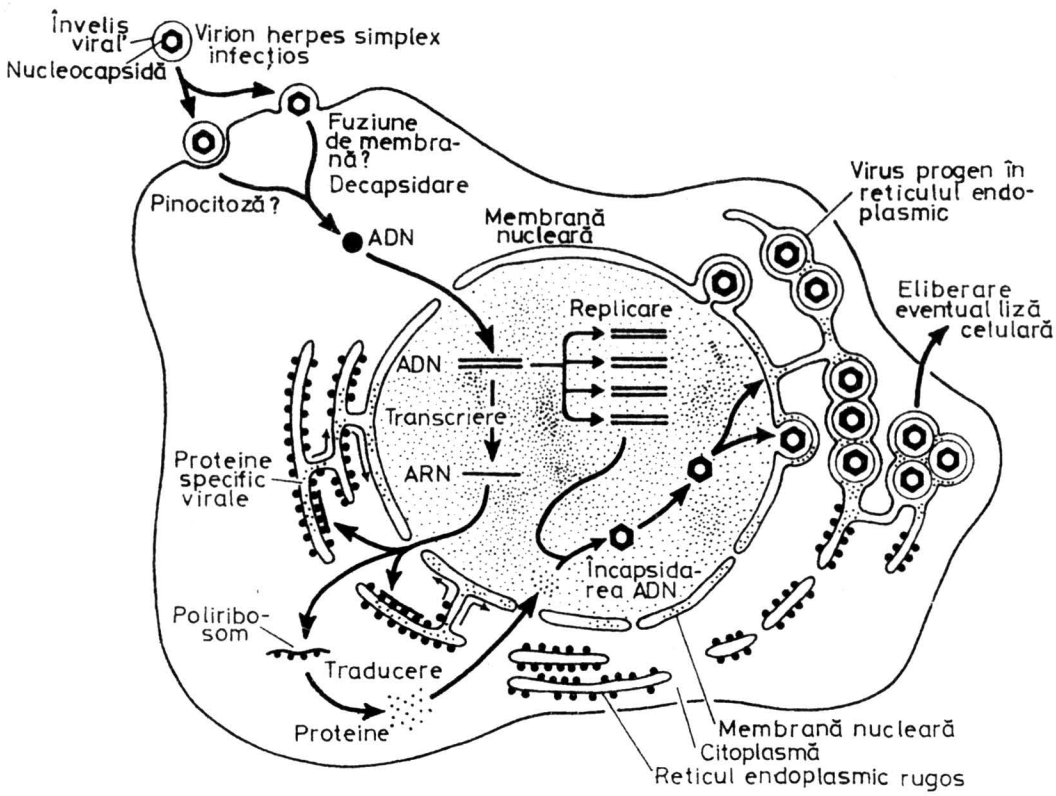


Fig. 148. Reprezentarea schematică a etapelor ciclului replicare a virusului Herpes simplex într-o celulă umană.

Glicoproteinele virale sunt transportate şi la nivelul membranei plasmatice şi celula infectată devine ţinta răspunsului imun .

Capsidele virale care au încorporat ADN genomic se ataşează de lamela internă modificată, a membranei nucleare şi se învelesc. Cele goale rămân nude, iar cele care conţin ADN mai scurt decât genomul standard sunt reţinute în nucleu. Situsul învelirii este lamela internă a membranei nucleare, unde procesul este foarte rapid. Invelirea se produce şi în citoplasmă, deoarece şi aici se observă capside juxtapuse membranelor plasmatice. Virionii sunt transportaţi în cisterne ale reticulului, care fuzionează cu membrana citoplasmatică şi îi eliberează la suprafaţa celulei.

În celulele permisive, *in vitro*, ciclul replicării virale durează 18-20 de ore.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Hepadnavirusuri

Familia *Hepadnaviridae* cuprinde virusul hepatitei B, infecţios pentru organismul uman, virusul hepatitei marmotei (*Monax monax*), virusul hepatitei veveriţei *Spermophilus beecheyi* şi virusul hepatitei B la raţa de Pekin.

Toate hepadnavirusurile au un înveliş de suprafaţă, care înconjură o nucleocapsidă electronodensă, sferică, ale cărei capsomere sunt probabil aşezate după modelul simetriei icozaedrice. Genomul lor este o moleculă de ADN cu dimensiuni asemănătoare. Au un mecanism unic al replicării ADN, care implică transcrierea inversă a unui ARN viral. Toate au un spectru de gazdă foarte îngust şi un tropism foarte evident pentru hepatocite. Hepatocitele infectate produc şi elimină cantităţi mari de înveliş viral neinfecţios, precum şi virioni infecţioşi, ce ating până la 500 μg/ml sânge. Aceste virusuri produc infecţii *persistente*, cu viremie ce durează ani de zile. Infecţiile cu hepadnavirusuri pot fi asociate cu hepatita acută şi cronică, cu carcinom hepatocelular, dar datorită persistenţei infecţiei şi producerii antigenelor în mare exces, infecţia se poate asocia cu maladii mediate de complexele imune.

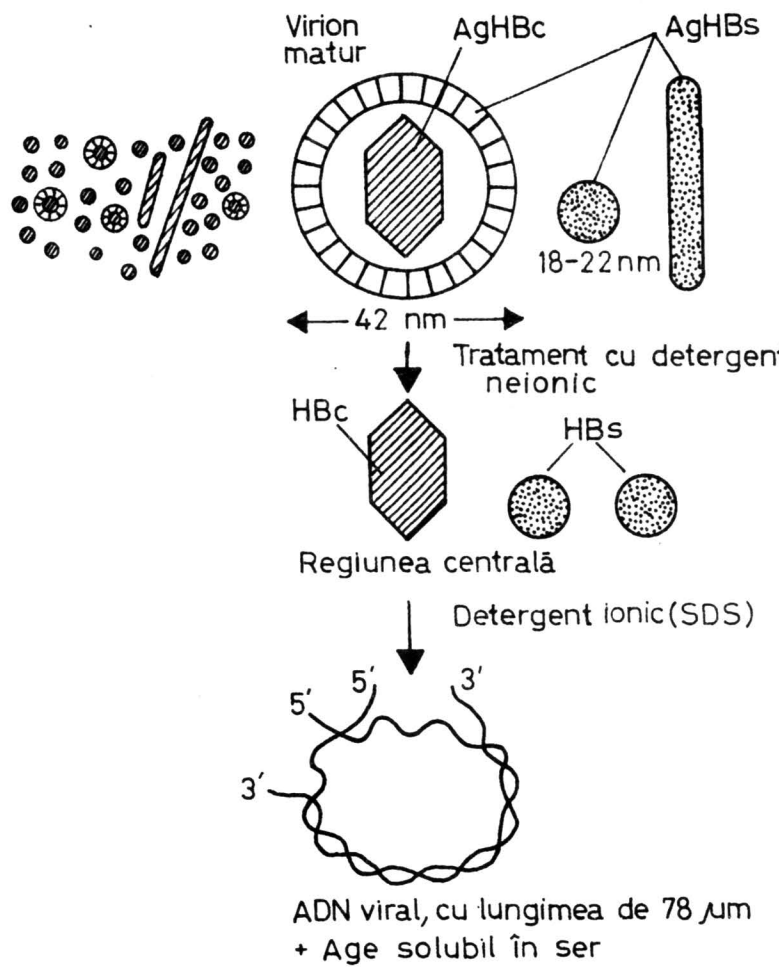


Fig. 149. Cele trei tipuri morfologice de particule prezente în serul pacienţilor cu hepatită virală B: virionul matur, particulele sferice mici (18-22 nm) şi cele tubulare (alungite). Virionii maturi conţin Ag HBs şi Ag Hbc („core"). În prezenţa detergentului ionic (SDS), din regiunea centrală se eliberează genomul viral şi antigenul endogen (HBe), prezent şi sub formă solubilă în ser (după Robinson, 1991).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Structura. Virionii hepatitei B (VHB) au formă sferică, cu diametrul de 42-47 nm. Genomul împreună cu capsida, formează *nucleocapsida*, acoperită de *învelişul extern*, cu o compoziţie chimică diferită de a peplosului celorlate virusuri.

Învelişul extern al virionilor constă din circa 240 subunităţi, cu o distribuţie ordonată şi conţine trei *proteine* diferite: *LHBs (L*arge), *MHBs* (*M*iddle) şi *SHBs* (*S*mall). Toate formează antigenul de suprafaţă al virusului (AgHBs), faţă de care se sintetizează anticorpi neutralizanţi. I se atribuie denumirea de "înveliş", dar este de natură proteică.

Proteina LHBs este alcătuită din subunităţile S, pre-S_1 şi pre-S_2; proteina MHBs conţine subunităţile S şi pre-S_1, iar SHBs este formată numai din subunitatea proteică S.

Capsida este alcătuită din subunităţi identice care conţin proteina HBc ("core"), alcătuită la rândul ei, din două subunităţi identice.

Particula virală care conţine regiunea centrală electronodensă (nucleocapsida), acoperită de înveliş, poartă denumirea de *particula Dane* (1970) şi reprezintă *virionul complet*.

In serul pacienţilor şi al purtătorilor se găsesc alte două tipuri de structuri;

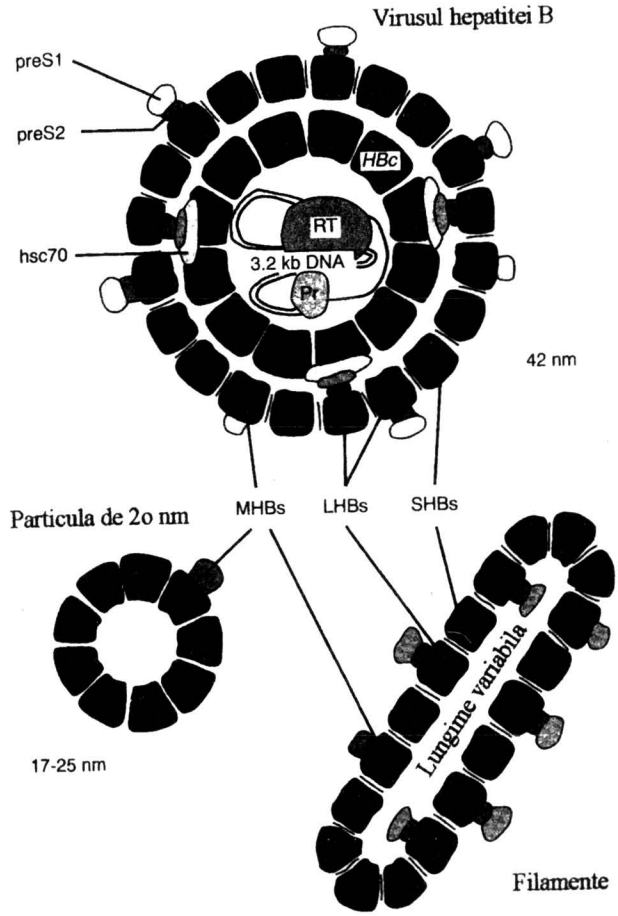


Fig. 150. Reprezentarea schematică a structurii moleculare a virusului hepatitei B. La extremităţile ADN parţial dublu catenar sunt legate proteina cu rol de primer (Pr) şi reverstranscriptaza (RT). Genomul este acoperit de capsidă, formată din 90-120 capsomere (HBc) dimere. Proteinele învelişului sunt de trei tipuri: SHBs (S, small = mic), MHBs (M, middle) şi LHBs (L = Large). Particulele sferice mici conţin numai SHBe şi MHBs (după Kann, 1998).

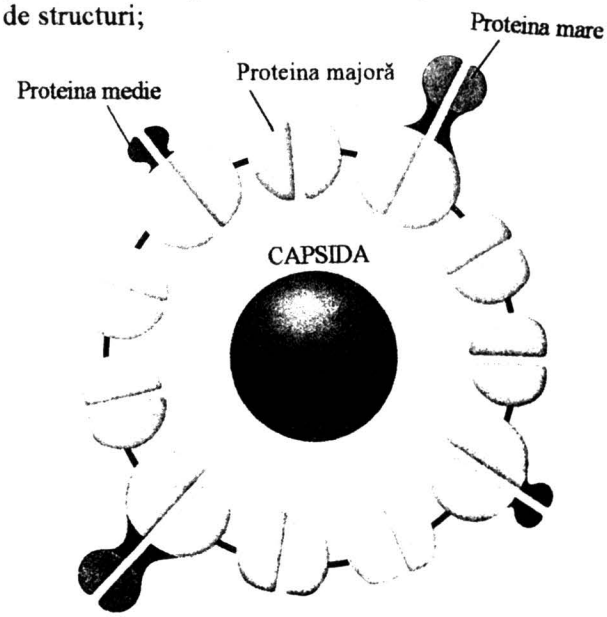


Fig. 151. Reprezentarea diagramatică a subunităţilor componente ale celor trei proteine HBs din învelişul virusului hepatitei B (după Tiollais, 1991).

- *unele sferice*, cu diametrul de 15-20 nm, în mare exces cantitativ, adesea fiind singurele structuri în serul purtătorilor;

- altele *alungite*, chiar filamentoase, cu grosimea de 20 nm şi lungimea de până la 200 nm.

Atât cele sferice cât şi cele alungite sunt *particule incomplete*, lipsite de genom. Ele conţin numai proteine ale învelişului: cele sferice conţin numai molecule SHBs şi MHBs, iar cele alungite posedă toate cele trei proteine (LHBs, MHBs, SHBs), componente ale AgHBs. Antigenul HBs s-a numit *antigen Australia* pentru că s-a descoperit în serul unui tânăr aborigen (Blumberg, 1965).

Densitatea virionilor compleţi în serul pacienţilor poate depăşi 10^9 particule/ml, iar celelalte forme

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

particulate, în special cele sferice, ating densităţi de 10^{13}/ml. Serul pacienţilor (sau al purtătorilor) este infecţios pentru cimpanzeu la diluţii de $10^{-7} - 10^{-8}$, sau chiar mai mari. Alteori, chiar nediluat, serul nu este infecţios, deoarece lipsesc virionii completi. Serurile neinfecţioase conţin numai structurile sferice mici, cu antigenul HBs.

Virionii completi sunt rezistenţi la eter, la fenol 0,25% şi îşi păstrează infecţiozitatea după încălzirea la 60° timp de 4 ore, sau după menţinerea la temperaturi scăzute.

Genomul. Hepadnavirusurile au cel mai mic genom dintre dezoxiribovirusuri, reprezentat de o moleculă de ADN circulară, parţial dublu catenară. Regiunea monocatenară ocupă 15-60% din lungimea genomului.

Molecula de ADN genomic este alcătuită dintr-o *catenă completă*, de polaritate negativă. Secvenţa sa este complementară faţă de ARNm şi, la diferite hepadnavirusuri conţine 3000-3300 nucleotide. Cea de a II-a catenă, de polaritate pozitivă are o lungime variabilă, între 1100-2600 nucleotide.

Catena completă este deschisă, deoarece prezintă două extremităţi libere. La capătul 5' este legat covalent un *polipeptid*. Din această cauză, capătul 5' nu poate fi fosforilat de polinucleotid-kinaza. Polipeptidul are rol de *primer* pentru sinteza acestei catene.

Pentru sinteza catenei scurte, rolul de primer revine unui *oligoribonucleotid*, de 19 nucleotide, legat la capătul 5' al catenei pozitive. Această secvenţă reprezintă capătul 5' al ARN pregenomic, care rămâne nedegradat.

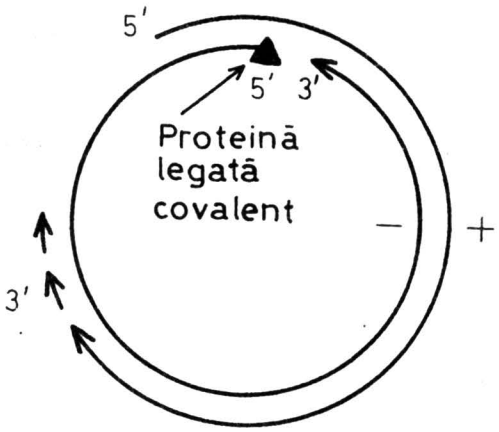


Fig. 152. Modelul general de structură a genomului unui hepadnavirus. Ambele catene ale moleculei de ADN genomic sunt lineare. La capătul 5' al catenei lungi se găseşte o proteină legată covalent, cu rol de primer. Catena scurtă are un număr variabil de nucleotide.

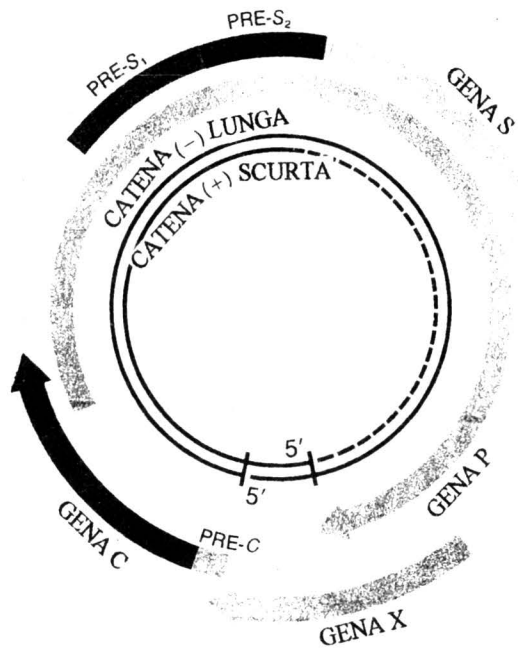


Fig. 153. Harta genetică a genomului virusului hepatitei H. Sunt ilustrate secvenţele genomice codificatoare şi proteinele codificatoare (după Tiollais, 1991).

Genomul conţine patru cadre de citire (ORF), parţial suprapuse, toate pe catena completă. Ele codifică următoarele proteine:

- proteina regiunii centrale (*HBc*) şi peptidul semnal al proteinei *HBc*, denumit *Hbe*. Peptidul *Hbe* rezultă din clivajul proteolitic al unei proteine precursoare a lui *HBc*;
- ADN-polimeraza;
- setul de proteine *HBs*;
- proteina *HBx*, cu funcţie necunoscută.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ciclul de multiplicare

Studiul multiplicării hepadnavirusurilor infecţioase pentru mamifere este îngreunat, datorită absenţei unui sistem celular *in vitro*, sensibil la infecţia virală. Cultura de hepatocite de embrion de raţă este sensibilă pentru câteva ore după diviziunea celulară, faţă de virusul hepatitei raţei de Pekin. Rezultatele obţinute în acest sistem experimental au fost extrapolate pentru hepadnavirusurile mamaliene şi în special pentru virusul hepatitei B umane. Ele s-au completat cu studii pe ţesutul hepatic infectat.

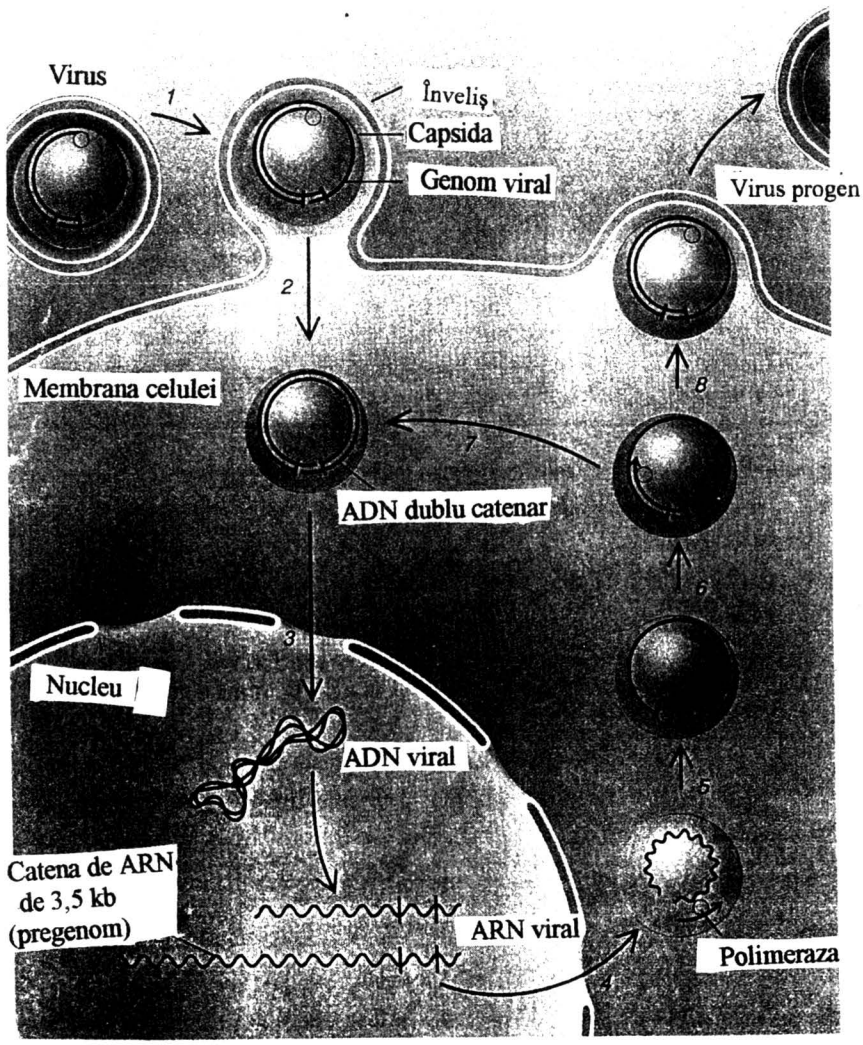


Fig. 154. Etapele replicării genomului hepadnavirusurilor. 1. Virionul infectează celula hepatică. 2. Enzimele completează sinteza catenei scurte a ADN genomic. 3. ADN viral migrează în nucleul celulei, unde este copiat în ARN. Catena de ARN (3, 5 kb) are rol de intermediar de replicare. 4. ARN pregenomic se împachetează cu proteina Pr, cu RT şi cu proteinele capsidei. RT catalizează sinteza unei molecule de ADN, pe matriţa de ARN pregenomic. 5. ARN pregenomic se dezintegrează, pe măsură ce molecula de ADN se sintetizează. 6. Polimeraza iniţiază sinteza celei de a II-a catene de ADN, folosind ca matriţă catena primară. 7. ADN viral poate să persiste în celulă un interval variabil, în care devine parţial dublu catenar sau revine în nucleu pentru un nou ciclu de replicare. 8. Genomul asociat cu proteinele capsidei este acoperit de proteinele învelişului. Sinteza catenei scurte de ADN se stopează (după Tiollais, 1991).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La intrarea în celula hepatică, antigenul suprafaţei virionilor este dezagregat printr-un mecanism necunoscut. Genomul ADN se deplasează spre nucleu, probabil în nucleocapsidă şi este convertit la ADN circular închis, detectabil în nucleul celulei. Conversia ADN genomic relaxat, la ADN circular covalent închis, necesită următoarele condiţii preliminare:

- completarea prin sinteză, a catenei de ADN genomic de polaritate pozitivă, care este mai scurtă cu câteva sute de baze. Sinteza ADN se face la capătul 3' al catenei scurte şi este catalizată de ADN-polimeraza virală, ataşată acestui capăt al moleculei;
- îndepărtarea proteinei primer de la capătul 5' al catenei de polaritate negativă şi a oligoribonucleotidului de la capătul 5' al catenei de polaritate pozitivă;
- legarea capetelor celor două catene.

Genomul, sub formă dublu catenară, închisă covalent are două posibilităţi de evoluţie:

- se integrează într-un cromosom al celulei şi catena de polaritate negativă este transcrisă de ARN-polimeraza II celulară, în ARN-pregenomic;
- cele două catene se separă: cea de polaritate pozitivă se supraspiralizează şi devine nefuncţională, iar catena de polaritate negativă este transcrisă în ARN pregenomic şi ARNm pentru sinteza proteinelor structurale majore ale virionului, a Ag HBs, a RT şi a proteinei primer pentru catena de polaritate negativă.

Procesul multiplicării hepadnavirusurilor este citoplasmatic. În citoplasmă, ARN pregenomic se asociază cu ADN-polimeraza dependentă de ARN (RT), cu proteina cu rol de primer şi cu proteina regiunii centrale a virionului (HBc) şi formează nucleocapside. Ele pot migra spre membrana nucleară, se dezasamblează şi eliberează genomul ADN nascent, în nucleul hepatocitului. Aici, genomul se maturează în ADN dublu catenar circular şi este transcris în ARN pregenomic şi ARN mesageri. Astfel se restabileşte cantitatea de genomuri virale (10-50 de copii) în nucleu, necesare sintezei componentelor sale proteice.

Majoritatea nucleocapsidelor rămân în citoplasmă şi sunt învelite prin asocierea cu proteinele componente, inserate în membranele reticulului endoplasmic granular. Proteinele HBs se maturează în cisternele golgiene, la nivelul cărora se asamblează particule virale complete, dar şi cele incomplete.

Proteinele componente ale învelisului viral (HBs) se sintetizează în mare exces, ele fiind astfel, atât proteine structurale cât şi nestructurale. Excesul de HBs nestructural, prezent în sânge, faţă de HBs legat de virionii compleţi, se datorează unei eliminări mai lente, dar are de fapt o semnificaţie profundă: probabil contribuie la inducerea toleranţei, ca o condiţie necesară pentru infecţia persistentă productivă la o gazdă imunocompetentă. Excesul de proteine HBs ar putea bloca receptorii pentru HBV ai limfocitelor, în stadiile tardive ale infecţiei persistente şi permite realizarea unui nivel al viremiei, care este o altă condiţie a transmisibilităţii infecţiei.

Perioada lungă de incubaţie (câteva saptămâni sau luni, între infecţie şi apariţia virionilor şi a proteinei HBs) s-ar putea explica atât prin ritmul lent al replicării, dar şi prin reabsorbţia imediată a virionilor progeni pe receptorii celulari, încă disponibili.

Proteina Hbe se găseşte în sângele purtătorilor înalt producători. Sinteza ei este codificată de ARN, care conţine nu numai gena pentru proteina HBc, ci şi o secvenţă "pre c" ("core") care codifică un peptid semnal, ce orientează peptidul nascent spre membranele reticulului endoplasmic şi determină translocaţia lui în lumen. Translocaţia este incompletă şi permite unei părţi a moleculelor Hbc să reintre în citosol şi posibil chiar în nucleu. Cea mai mare parte a Hbc este clivată succesiv, la nivelul reticulului şi al cisternelor Golgi şi rezultă proteina de 16-18 kD din ser. Hbe nu se asamblează în virioni.

Virusul hepatitei B umane se poate elibera din celulă în orice moment după asamblarea citoplasmatică, deoarece în sânge se găsesc virioni cu genom hibrid ADN-ARN sau virioni care conţin numai catena ADN de polaritate negativă (genom monocatenar).

ADN viral se replică printr-un mecanism neobişnuit, care implică *transcrierea inversă* a unei copii de ARN pregenomic, mecanism considerat anterior ca fiind unic pentru retravirusuri.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

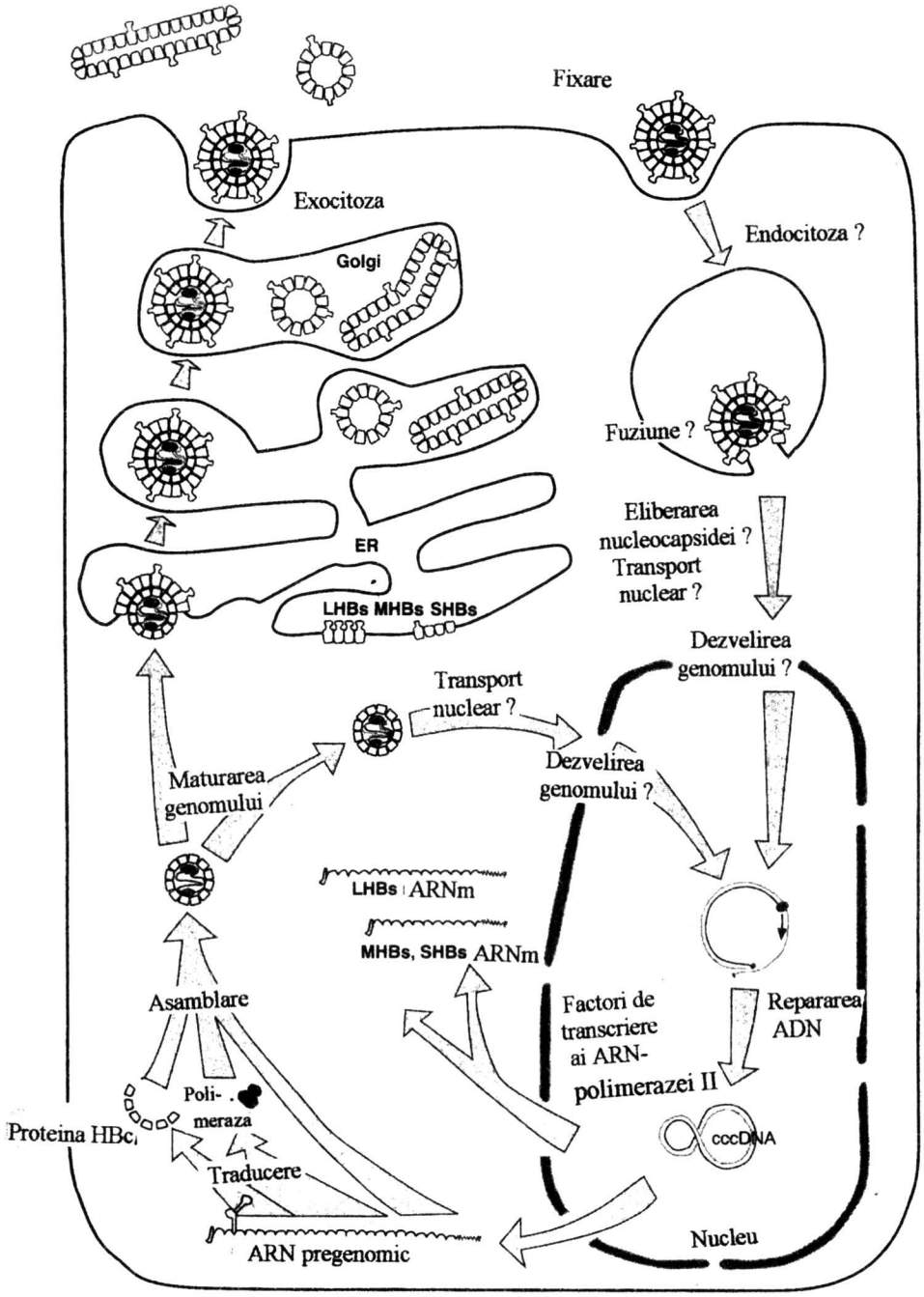


Fig. 155. Reprezentarea schematică a ciclului de replicare a virusului hepatitei B. Amănunte în text (după Kann, 1998).

ADN-polimeraza virală nu are un situs cu activitate de integrază (spre deosebire de cea retravirală), iar integrarea nu face parte din ciclul de replicare a hepadnavirusurilor. Totuşi, integrarea ADN viral este un eveniment frecvent. ADN viral s-a evidenţiat în stare integrată în tumorile hepatice umane şi ale raţei de Pekin. Premergător integrării, genomul viral este clivat şi nu mai este transcris în ARN pregenomic. ADN de HBV integrat este adeseori format din două sau mai multe fragmente, legate cap-coadă sau în alte succesiuni.

După integrarea genomului viral în unul din cromosomii celulei hepatice, infecţia devine persistentă şi se sintetizează antigene virale. Liniile celulare maligne, *in vitro* elimină particule cu diametrul de 20 nm. Integrarea destabilizează genomul gazdei prin mecanisme necunoscute.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La adulţi, de regulă, infecţia este inaparentă. După infecţia acută, majoritatea adulţilor se sterilizează într-un interval oarecare. Dar circa 5–10% rămân infectaţi cronic, persistent şi dezvoltă hepatite cu severitate variabilă.

Structura şi replicarea virusurilor cu organizare complexă

Poxvirusuri

Denumirea "pox" provine de la cuvântul englezesc "pock" (pustulă, ulceraţie). Familia *Poxviridae* include cele mai mari şi mai complexe virusuri, patogene pentru om şi animale, la care produc infecţii generalizate, cu erupţii veziculare sau pustulare cutanate (variola, vaccina) sau tumori benigne la om (*Molluscum contagiosum*) şi la iepure (fibromul Shope). În funcţie de gazda pe care o infectează se disting mai multe genuri: *Orthopox* (variola, vaccina, etc.), *Parapox (Orf)*, *Capripox* (infecţioase pentru ovine, caprine), *Leporipox* (produce papilomul Shope la iepure), *Suipox* (infecţios pentru porc), *Avipox* (infecţios pentru păsări), *Moluscipox* (produce tumori benigne la om) şi *Yatapox* (produce tumori benigne la primate).

Structura. Cel mai studiat este virusul vaccinei, cu formă paralelipipedică (cărămidă cu colţurile rotunjite) şi dimensiuni de 220 x 220 x 280 nm, la limita de rezoluţie a microscopului optic.

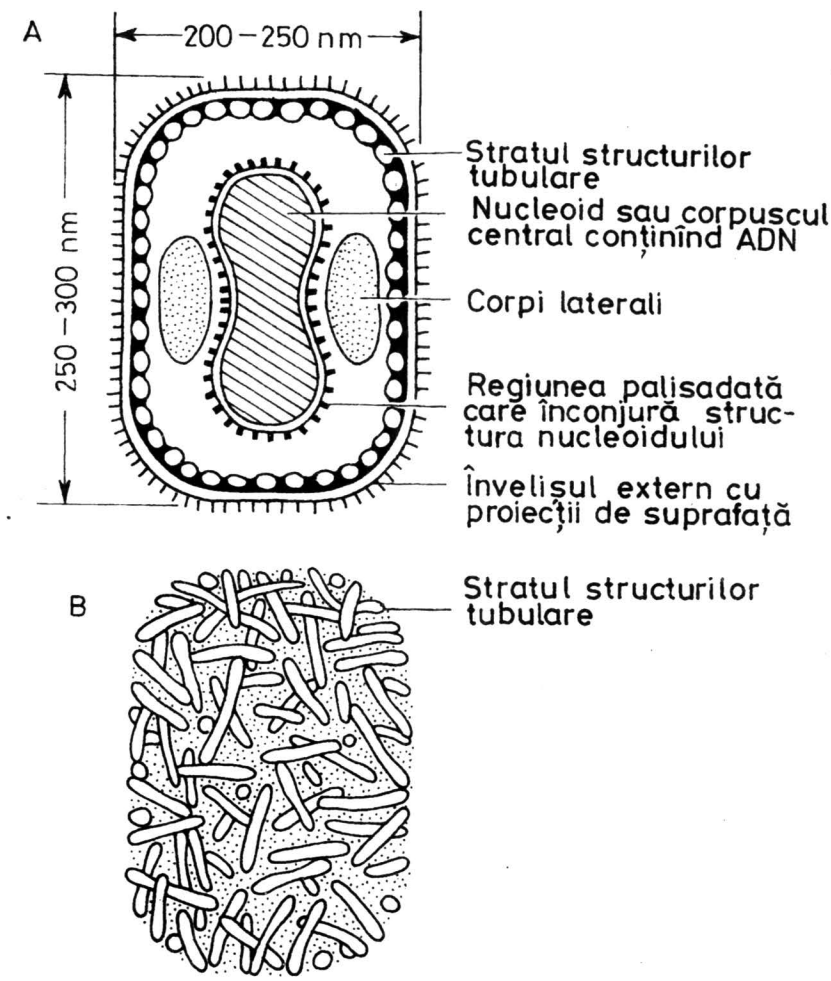


Fig. 156. Reprezentarea schematică a structurii virionului Pox, pe baza imaginilor electrono-optice ale preparatelor colorate negativ şi ale secţiunilor ultrafine. A. Secţiune frontală prin virion, cu evidenţierea structurii interne. B. Diagrama prezintă distribuţia structurilor tubulare care formează un strat complex ce acoperă nucleoidul şi corpii laterali (după Horne, 1978).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virionul este format dintr-un nucleoid, bine delimitat pe imaginile electrono-optice ale virusului în secţiune frontală, în care se găseşte ADN viral, având de fiecare parte câte o masă laterală, denumită *corp lateral*. In virion, nucleoidul are formă de disc biconcav, cu aspect de halteră. Nucleoidul este acoperit de *membrana internă* omogenă şi un strat extern alcătuit din subunităţi cilindrice scurte, cu aspect striat.

Zonele concave ale nucleoidului sunt ocupate de corpii laterali, de natură proteică. La exterior se găseşte *membrana externă*, de natură lipoproteică, care conţine toate fosfolipidele virionului, colesterol şi grăsimi neutre. Membrana externă este formată din două straturi: intern şi extern.

Compoziţia chimică. Componentele principale ale virionului sunt proteinele (90%), lipidele (5%) şi acizii nucleici (3,2%). Proteinele se solubilizează la 100° în prezenţa SDS şi a unui agent reducător. La electroforeza bidimensională se disting circa 100 de proteine, dar numărul lor este mult mai mare.Numai în înveliş se găsesc 10 polipeptide, dintre care 9 sunt glicozilate.

Reprezentanţii familiei *Poxviridae* codifică un set de enzime mult mai diversificat în comparaţie cu alte virusuri, unele esenţiale pentru desfăşurarea ciclului de replicare, iar altele neesenţiale. Dintre cele esenţiale fac parte *ARN-polimeraza* dependentă de ADN, enzimele de prelucrare post-transcriere a ARN (de bonetare şi adenilare), *ADN-polimeraza* şi *topoizomeraze ADN* (enzime care modifică configuraţia spaţială a ADN, prin ruperea catenelor, producând relaxarea ADN suprahelical, în absenţa unui cofactor energetic). Discontinuităţile create prin clivarea unei catene sunt reunite prin acţiunea *ligazei*, din echipamentul enzimatic al virionului.

Genomul poxvirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, care conţine 130-300 kbp (85 000 kD la parapoxvirusuri şi 185 000 kD la avipoxvirusuri). Capetele catenelor au o configuraţie în buclă de ac de păr, cu secvenţe terminale repetate invers, bogate în A-T. La nivelul secvenţelor terminale, cele două catene sunt legate covalent şi formează un lanţ nucleotidic continuu. Prin denaturare, molecula devine circulară monocatenară.

Ciclul de replicare

Poxvirusurile, iridovirusurile insectelor, precum şi virusul febrei suine africane au o particularitate unică printre dezoxiribovirusuri, ce constă în aceea că ciclul lor de multiplicare se desfăşoară în citoplasmă, fiind total independent de nucleul celulei. S-a demonstrat experimental, că replicarea genomului acestor virusuri are loc şi în celulele enucleate cu citocalazina B.

Virionul este înglobat în celulă, prin pinocitoză mediată de receptori, a căror structură moleculară nu este cunoscută. Se presupune că factorul de creştere epidermică (EGF) ar avea şi rolul de receptor de virus. Membrana virală externă fuzionează cu membrana vacuolei de endocitoză şi genomul este eliberat din regiunea centrală. ADN genomic purificat nu este infecţios, deoarece sinteza ARNm este catalizată de ARN-polimeraza dependentă de ADN, o enzimă din echipamentul virionului. ARNm este transcris la câteva minute după infecţie. Transcrierea nu este blocată de inhibitorii sintezei proteice sau ai replicării ADN. In etapa timpurie este transcrisă circa jumătate din setul de gene.

Replicarea genomului începe în primele 6 ore după infecţie şi furnizează circa 10 000 de copii genomice. Mecanismul replicării este puţin cunoscut. Genomul celorlalte dezoxiribovirusuri are o singură origine a replicării, dar la poxvirusuri, având dimensiuni mult mai mari prezintă puncte multiple de iniţiere a replicării, ca şi ADN al celulei eucariote.

Replicarea ADN este iniţiată la nivelul inciziilor monocatenare, produse de o DN-ază virală şi progresează prin mecanismul deplasării uneia din catenele parentale. Iniţial, se sintetizează fragmente mici de ADN, legate covalent de primerii ARN. Fragmentele scurte sunt ligaturate şi rezultă un intermediar de replicare, care este un concatemer dublu catenar, format dintr-o pereche de genomuri.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

In faza tardivă a ciclului de replicare, este transcris restul informaţiei genetice, fapt relevat prin metodele de hibridre ADN-ARN. Circa 30% din lungimea genomului codifică molecule neesenţiale pentru ciclul de replicare virală.

Dinamica procesului de multiplicare a fost analizată atât structural, cât şi prin metode biochimice la virusul vaccinal. Este citocid şi pentru că inhibă sinteza ADN şi a proteinelor celulare, uşurează analiza biochimică a procesului.

Structural, multiplicarea virusului începe în *incluzii de tip B*, în care se găsesc virioni în diferite stadii de asamblare. Primele structuri detectabile electrono-optic în celulele infectate sunt nişte formaţiuni semilunare tridimensionale, ce constau dintr-o membrană dublă tapetată cu spiculi proeminenţi, ce formează o bordură în perie pe suprafaţa convexă şi un material granular, adiacent suprafeţei concave. Membranele sunt sintetizate *de novo* şi nu sunt asociate cu nici-un organit celular. Spiculii le conferă rigiditate şi determină dimensiunile particulei virale imature. Genomul viral şi proteinele asociate intră în învelişul imatur, înainte ca acesta să se închidă complet.

In interiorul structurilor delimitate de membrana dublă, începe condensarea nucleoidului. In incluziile de tip B ("fabrici de virus") în care are loc asamblarea, poliribosomii lipsesc. Proteinele virale sunt transportate de la locul sintezei, la "fabrica de virus".

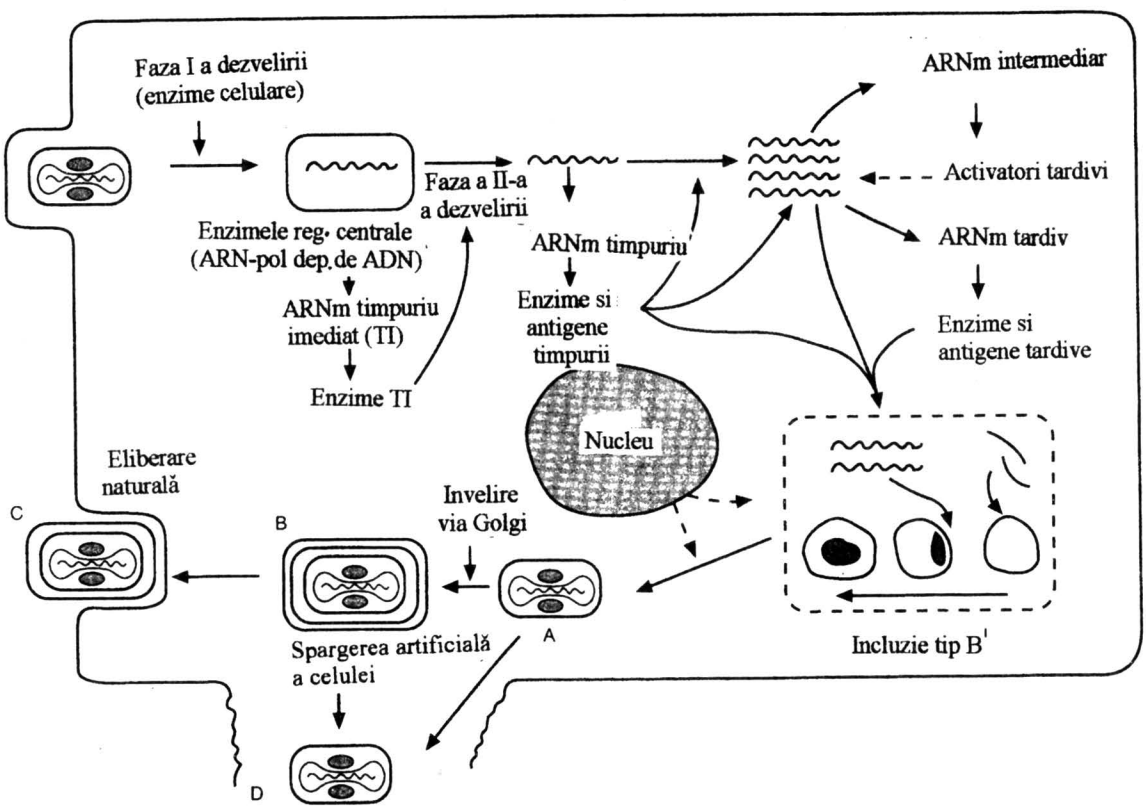


Fig. 157. Reprezentarea diagramatică a ciclului de replicare a unui poxvirus. A = particulă virală infecţioasă detectată prin extracţie artificială din celulele infectate; particula A este acoperită cu o membrană dublă derivată din cisternele Golgi (B). La contactul cu membrana citoplamatică se pierde membrana externă (C) (după Baxby, 1998).

Virionii imaturi delimitaţi de membrana dublă asamblată *de novo* (viitoarea membrană internă a virionului matur) sunt transportaţi din aria de asamblare spre periferia celulei. Pe acest traseu, virionii se învelesc cu alte membrane suplimentare. Studiile cito-imunochimice sugerează ca virionii imaturi îşi asamblează membrana dublă externă la nivelul reţelei trans-Golgi, un compartiment intermediar între reticulul endoplasmic granular şi cisternele golgiene. Virionii cu membrana externă dublă, pierd stratul extern al membranei, prin fuziune cu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

membrana citoplasmatică, pe măsură ce sunt eliberaţi din celulă. Din acest punct de vedere se poate spune că poxvirusurile se eliberează prin înmugurire, dar la contactul cu membrana se pierde un strat al membranei externe.

Unele poxvirusuri (cowpox, avipox, etc.) produc *incluzii de tip A*. Acestea sunt corpi mari electronodenşi ce conţin ribosomi.

Extractele virus-free din celulele infectate, evidenţiază la electroforeza bidimensională numeroase polipeptide structurale sintetizate în exces, dar şi numeroase proteine "solubile", biologic active, neesenţiale, care interferă cu mecanismele de apărare a gazdei, au rol în virulenţă sau îndeplinesc ambele funcţii. Astfel s-a identificat *hemaglutinina*, o proteină a învelişului, dar prezentă şi în stare liberă în citoplasma celulei infectate. Foarte importante sunt proteinele biologic active din categoria *viroceptorilor*. Termenul semnifică produse genice virale care au omologie funcţională cu receptorii celulari de *citokine* (receptorul pentru interferonul gama, receptorul pentru IL-1 beta, receptorul pentru TNF), inhibând mecanismele de apărare a gazdei, stimulate de citokine. Moleculele omologe receptorilor de citokine codificate de poxvirusuri se găsesc numai în formă "solubilă", nefiind componente structurale ale virionilor.

O altă categorie de molecule codificate de poxvirusuri sunt cunoscute sub denumirea de *virokine*. Termenul reuneşte molecule codificate de genele virale, care au omologie funcţională cu citokinele şi influenţează funcţiile celulare într-un mod asemănător. Poxvirusurile codifică omologi ai EGF, un factor de creştere a endoteliului vascular, un inhibitor al serin-proteazei (serpin) ce inhibă activarea citokinelor şi diminuă procesul inflamator, proteine de legare a complementului (receptorul pentru C_4), proteine ce inhibă exprimarea moleculelor CMH I pe suprafaţa celulelor, diminuând recunoaşterea lor de către limfocitele Tc.

In celula infectată se sintetizează o serie de protein-kinaze (de exemplu, timidin-kinaza) şi ribonucleotid-reductaza, cu aceleaşi semnificaţii funcţionale pe care enzimele respective le au la herpesvirusuri. Gena Tk nu este esenţială pentru multiplicarea poxvirusurilor în celulele cultivate, dar conferă un avantaj selectiv pentru desfăşurarea ciclului infecţios în celulele care nu se divid şi au o rezervă scăzută de acid timidilic.

Ribonucleotid-reductaza converteşte ribonucleotidele la precursori ai sintezei ADN. ADN-polimeraza, cu rol în replicarea genomului este codificată de virus, fapt ce permite desfăşurarea ciclului de replicare virală în citoplasmă. Polinucleotid-ligaza (enzima ce repară breşele în molecula de ADN) creşte de 10 ori în faza timpurie a replicării virale.

Prin complexitatea lor biochimică, prin diversitatea enzimelor pe care le conţin, poxvirusurile se abat mult de la modelul general de structură a celorlalte virusuri. Faptul că ele se multiplică în citoplasmă, fără participarea enzimelor nucleare este o reflectare a complexităţii lor funcţionale. Deşi complexă şi diferită de a celorlalte virusuri, structura lor nu întruneşte particularităţile sistemelor biologice.

Structura şi replicarea retravirusurilor

Retravirusurile sunt o familie mare de virusuri ale vertebratelor, foarte importante pentru patologia umană şi animală, dar şi instrumente de studiu experimental de o valoare remarcabilă. Ele au o organizare structurală şi genetică uniformă, dar manifestă o gamă largă de interacţiuni cu gazdă, de la infecţii benigne produse de virusurile endogene, infecţii moderat patogene produse de virusuri exogene, până la consecinţele fatale ale infecţiei cu virusul imunodeficienţei şi ale celor rapid oncogene.

Clasificare. Familia *Retraviridae* a fost împărţită în 3 subfamilii pe baza criteriilor de patogenitate : *Oncovirinae, Lentivirinae* şi *Spumavirinae*.

Virionii acestei familii se descriu în funcţie de tipul structural (tip A, B, C, D), de receptorul celular care mediază pătrunderea, de modul de propagare (dacă sunt *exogene* se transmit pe orizontală, iar dacă sunt *endogene* se transmit pe verticală, prin mecanisme mendeliene, de la o generaţie la altă, ca *provirus* integrat în celulele liniei germinale sau după prezenţa sau absenţa unei oncogene în genomul lor).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virusurile *endogene* pot fi copii complete ale provirusului ADN, dar în mod obişnuit nu se manifestă ca particule virale infecţioase. Nu realizează un ciclu complet de replicare. Rareori, spontan, se manifestă ca virioni compleţi, infectioşi. Asamblarea virionilor poate fi indusă de raze X, inhibitori ai sintezei proteice, citokine eliberate în focarul de inflamaţie, hormoni steroizi.

Virusurile oncogene cu genom ARN (Oncornavirusuri) sunt incluse în subfamilia *Oncovirinae*. Ele induc malignităţi din categoria *sarcoamelor, leucemiilor, limfoamelor* şi *carcinoamelor mamare*. Sunt infecţioase pentru o largă diversitate de specii, de la peşti până la om.

Subfamilia *Oncovirinae* cuprinde mai multe grupuri de virusuri :

- grupul *virusurilor aviare*, care induc leucoze şi sarcoame, include virusuri exogene şi endogene (virionii sunt de tip C);

- grupul virusurilor *mamaliene de tip C* include virusuri endogene şi exogene infecţioase pentru rozătoare, carnivore, primate. Unele tulpini de virus conţin gene oncogene ;

- *grupul HTLV-BLV* (*H*uman *T(B)* *l*ymphotropic *v*irus) cuprinde virusuri exogene care produc limfoame ale limfocitelor B la bovine şi ale limfocitelor T la om.

Subfamilia *Lentivirinae* cuprinde virusuri exogene ce produc maladii neurologice şi deficienţe imunitare, fără a fi implicate pe cale directă în producerea malignităţilor : HIV 1, HIV 2, virusul imunodeficienţei bovinelor (BIV), virusul imunodeficienţei felinelor (FIV), virusul imunodeficienţei maimuţelor (SIV), virusul imunodeficienţei şi encefalopatiei caprinelor (cAEV), virusul Visna, virusul anemiei hemolitice a calului etc.

Subfamilia *Spumavirinae* cuprinde virusuri care produc infecţii persistente, cu vacuolizarea celulelor *in vitro*. S-au izolat de la om şi de la primate. *In vivo* nu produc îmbolnăviri cunoscute şi definite clinic.

Oncornavirusuri

Cele mai studiate sunt *virusul sarcomului Rous* (*VSR*) şi *virusul leucemiei aviare* şi *murine*. VSR nu este un virus natural, deoarece nu persistă în populaţiile animale, ci este o creaţie de laborator, transferată şi păstrată de virologi.

Morfologie. Virionii oncornavirusurilor au formă sferică, cu diametrul de 100-130 nm. Nucleocapsida (regiunea centrală) are formă nedefinită (sferică, alungită, conică) şi include genomul şi 3-4 proteine, cu rol catalitic în replicare. Nucleocapsida este acoperită de peplos, format din dublul strat fosfolipidic, de origine membranară, în care sunt inclavaţi spiculii glicoproteici, codificaţi de virus, cu formă prismatică şi butonată. Învelişul este dobândit în cursul maturării virionilor, prin procesul de înmugurire din membrana plasmatică a celulei.

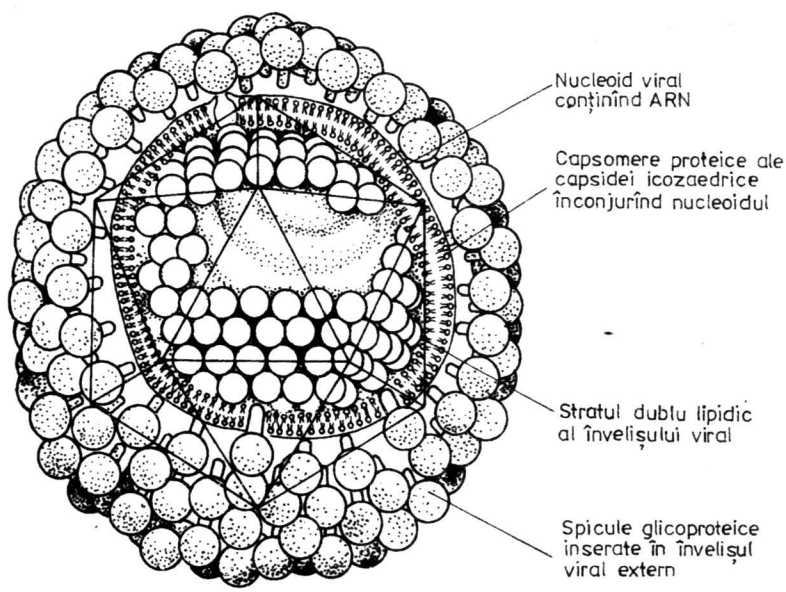


Fig. 158. Reprezentarea schematică a organizării moleculare a unui retravirus. Un sector al capsidei a fost îndepărtat. Spiculele glicoproteice butonate sunt inserate printr-un pedicul în învelişul viral (după Watson, 1977).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Regiunea centrală a virionului (engl. "core") este formată din genomul ARN, asociat cu câteva proteine virale şi este acoperită de o capsidă proteică, alcătuită din circa 390 de capsomere, aşezate după modelul simetriei icozaedrice. Fiecare capsomeră este formată prin agregarea mai multor polipeptide, de 3-4 tipuri. Genomul este împachetat strâns în capsidă şi după dezagregarea blândă a virionului devine filamentos. Regiunea centrală conţine o proteină esenţială în procesul de multiplicare virală - *revers-transcriptaza.*

Criteriul vechi de clasificare al oncornavirusurilor (particule de tip A, B, C, D) are la bază aspectul electrono-optic al virionilor şi al precursorilor lor în celula infectată.

Particulele de *tip A* corespund regiunii centrale (nucleocapsida), asamblată în citoplasmă, înainte de înmugurire.

Particulele de *tip B* se formează prin învelirea, în procesul înmuguririi la nivelul membranei citoplasmatice, a particulelor de tip A, preasamblate în citoplasmă.

Pentru particulele de *tip C*, caracteristic este faptul că nucleocapsida se asamblează treptat, pe măsură ce înmugurirea progresează (co-asamblare).

Particulele de *tip D* rezultă prin înmugurirea nucleocapsidelor preasamblate, dar regiunea internă are aspect tubular, ceea ce le deosebeşte de particulele de tip B.

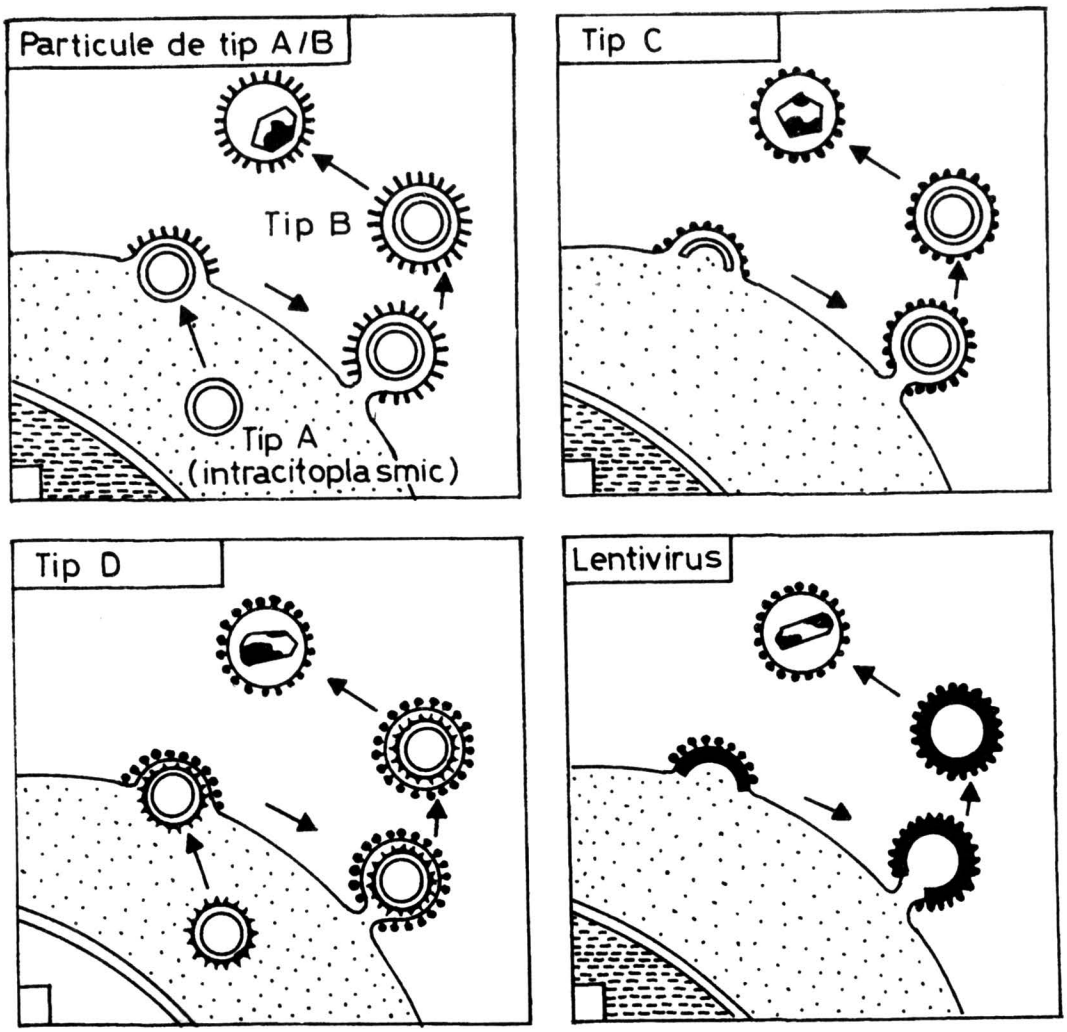


Fig. 159. Reprezentare schematică a particularităţilor de asamblare a virionilor de tip A, B, C şi D.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

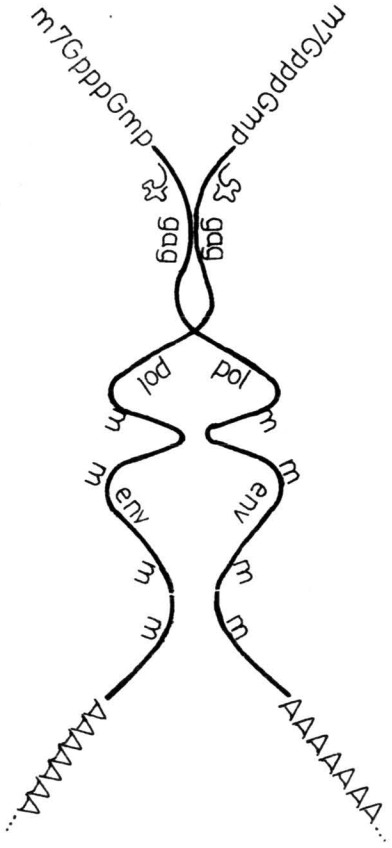


Fig. 160. Modelul ipotetic al organizării genomului diploid al retravirusurilor (după Coffin, 1991).

Genomul retravirusurilor este unic printre virusuri, în privinţa câtorva aspecte (organizare, modul de replicare, funcţii) :

- este singurul genom diploid ;
- este singurul replicat şi prelucrat de aparatul de transcriere şi replicare a ARNm celular;
- este singurul asociat cu ARN specific celulei, a cărei funcţie este iniţierea replicării;
- este singurul genom ARN de polaritate pozitivă, care după infecţie nu funcţionează ca ARNm.

Genomul retravirusurilor are o structură dimerică. După extracţia din virioni, fără denaturare, proprietăţile fizice (sedimentare, mobilitate electroforetică) denotă că genomul are dimensiuni duble faţă de moleculele denaturate. Cele două molecule au secvenţe identice de baze şi probabil au numeroase puncte de asociere, necovalente, dar cel mai stabil este la capătul 5' al fiecărui genom. Cele două molecule (35 S fiecare) sunt identice, având aceiaşi secvenţă de baze şi formează un ansamblu de 70 S.

Semnificaţia diploidiei retravirusurilor, în procesul de multiplicare nu este cunoscută, dar una din consecinţe este rata foarte înaltă a evenimentelor de recombinare care are loc la aceste virusuri. Frecvenţa crescută a recombinărilor permite repararea eficientă a leziunilor fizice ale genomului.

Genomul retravirusurilor este transcris din provirusul ADN, în molecule de ARN, de enzimele celulare, care ulterior le şi prelucrează. La capătul 5', ARN viral este bonetat sub forma m7GpppGmp, foarte importantă pentru traducerea moleculelor de ARNm. Ca şi ARNm celular, ARN genomic viral este modificat la nivelul unor resturi de adenină, prin metilare (metilări interne), iar la capătul 3', genomul retravirusurilor conţine o secvenţă de circa 200 resturi de poli-A, o modificare tipică celor mai multe ARNm la eucariote.

Genomul este asociat cu alte molecule, care se evidenţiază după denaturarea genomului nativ: ARNt şi ARN de tip ribosomal. Cea mai importantă este unica moleculă de ARNt/genom, asociată cu o secvenţă complementară, aproape de capătul 5' al genomului. ARNt funcţionează ca primer, la nivelul căruia revers-transcriptaza iniţiază sinteza ADN. Funcţia celorlalte tipuri de ARN din virion nu este cunoscută.

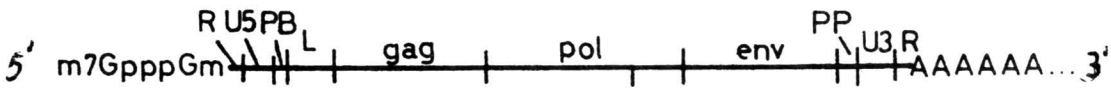


Fig. 161. Ordinea genelor în genomul retravirusurilor (după Coffin, 1991).

In regiunile terminale ale genomului se găsesc secvenţele necodificatoare, cu rol de semnale pentru sinteza ADN sau ARN şi pentru prelucrare, iar regiunile interne au funcţii de codificare a proteinelor. Incepând cu capătul 5', secvenţele comune tuturor retravirusurilor sunt:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- *secvenţele R* (*R*edundant), cu o lungime variabilă, de 12-135 de baze sunt identice la ambele capete ale genomului, la toate retravirusurile şi au rol important în procesul transcrierii inverse, deoarece permit transferul ADN nascent, de la un capăt la celalalt al matriţei de ARN genomic;

- *secvenţa* U_5 este prima copiată în ADN, în transcrierea inversă şi devine capătul 3' al secvenţei lungi repetată terminal (*LTR* = *L*ong *T*erminal *R*epeats), ce flanchează catena ADN;

- *secvenţa PB* (*P*rimer *B*inding) este formată din 18 nucleotide şi constituie situsul de ataşare a primerului ARNt, pe baza unei complementarităţi perfecte;

- secvenţa L (Leader) precede prima regiune tradusă şi are cel puţin două funcţii: a) este situsul de iniţiere pentru transcrierea tuturor tipurilor de ARNm înădite. Toate tipurile de ARNm sunt înădite din acest punct, dar au secvenţe diferite; b) secvenţa L specifică încorporarea ARN genomic în virion, având astfel rolul semnalului de împachetare a genomului;

- *regiunea codificatoare*, localizată de la începutul genei *gag* până la sfârşitul genei *env* este tradusă în întregime. Se produce chiar o suprapunere a cadrelor de citire. Regiunea tradusă conţine semnale interne, cu rol de situsuri de înădire, de unde se formează diferite tipuri de ARNm;

- *secvenţa PP* (*Poli*purinică) conţine cel puţin 9 resturi de A şi G. Aici se iniţiază sinteza catenei ADN de polaritate pozitivă;

- *secvenţa* U_3 (*U*ntranslated), netradusă, este simetrică secvenţei U_5 şi devine capătul 5' al LTR, care flanchează catena de ADN.

Regiunea codificatoare cuprinde gene care codifică proteine virionale, aşezate în aceiaşi ordine la toate retravirusurile.

Regiunea gag codifică antigenul specific de grup. ARNm este transcris din toată secvenţa *gag*, tradus ulterior într-o poliproteină precursoare, supusă la rândul ei unui proces de clivare în 3-5 proteine capsidale. Cele trei proteine codificate constant de secvenţa *gag* sunt: *proteina matriceală (MA,* adică proteina *Gag* în strânsă asociaţie cu învelişul viral), *proteina capsidală (CA,* componenta structurală majoră a virionului) şi *proteina asociată ARN genomic (NC,* bazică, fosforilată, de dimensiuni mici şi probabil importantă pentru asamblarea virionului).

Regiunea *pro* codifică sinteza proteazei, care clivează poliproteinele *gag* şi *pol.*

Regiunea pol codifică sinteza a două proteine foarte importante în fazele timpurii ale ciclului infecţios: *revers-transcriptaza (RT)* şi *integraza (IN),* care catalizează integrarea ADN viral într-un cromosom celular.

Secvenţele *pro* şi *pol* nu sunt gene distincte. Ele sunt transcrise în ARNm al genei *gag,* iar traducerea lor are loc numai în cazul în care complexul enzimatic al traducerii depăşeşte codonul semnal de terminare, astfel încât traducerea se continuă în cadrul *pro* şi *pol.* Toate proteinele precursoare care conţin proteinele *pro* şi *pol,* conţin întreaga proteină *gag.*

Regiunea env codifică o glicoproteină precursoare de înveliş, de 160 kD, clivată în glicoproteina de 120 kD- *SU* (*S*urface) şi *TM* (*T*ransmembrane), de 40 kD. După clivare, cele două proteine rămân asociate prin legături necovalente. Proteina *SU* are rolul de a recunoaşte receptorul celular, iar proteina *TM* ancorează complexul *proteina SU-receptor,* de învelişul viral.

Spre deosebire de celelalte gene, genă *env* este tradusă dintr-un ARN subgenomic înădit.

Proteinele enzime ale virionului. Produsul de sinteză a genei *pol* este scindat de proteaza virionică şi rezultă peptidul N-terminal, care este *revers-transcriptaza* (RT), iar regiunea C-terminală este *integraza.* RT, spre deosebire de alte polimeraze virale, este uşor separabilă de componentele virionului.

Integraza este o enzimă importantă pentru desfăşurarea ciclului de replicare. Mutantele virale care nu sintetizează această enzimă nu se multiplică .

Proteaza catalizează clivările ce separă proteinele *gag* şi *pol* una de cealaltă.

Proteinele de înveliş sunt asemănătoare la toţi membrii familiei. Complexul proteic al virionului este format din două catene polipeptidice, legate prin punţi S-S:

- *proteina SU,* glicozilată, are rolul de a recunoaşte receptorul membranar al celulei sensibile. Anticorpii specifici neutralizează infecţiozitatea virală;

- *proteina TM,* glicozilată, are trei domenii: citoplasmatic (20-30 de aminoacizi), transmembranar şi extern, asociat cu *proteina SU.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

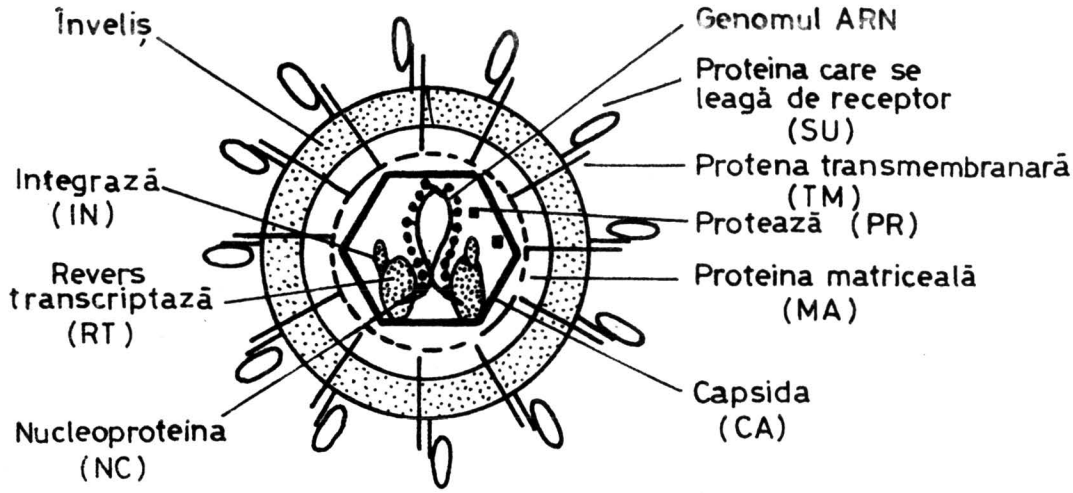


Fig. 162. Reprezentare schematică a structurii moleculare a unui retravirus. Este indicată localizarea principalelor proteine ale virionului (după Coffin, 1991).

Ciclul de multiplicare

Ciclul de multiplicare a retravirusurilor are două faze distincte, separate de treapta *integrării*. Evenimentele primei faze sunt catalizate de proteinele virionului, iar cele ale fazei a II-a, de enzimele celulare.

Virionii retravirusurilor se ataşează de moleculele receptor ale celulei sensibile prin intermediul *proteinei SU*. După interacţiunea specifică a *proteinei SU*, cu receptorul celular, învelişul viral şi membrana fuzionează, iar nucleocapsida virionului este eliberată în citoplasmă. In interiorul nucleocapsidei are loc transcrierea inversă a ARN genomic, în ADN dublu catenar, proces catalizat de RT virală. ADN este intermediarul de replicare al retravirusurilor. Concluzia existenţei intermediarului ADN a fost emisă de H. Temin şi D. Baltimore (1970), pe baza rezultatelor experimentale cu privire la sensibilitatea replicării acestor virusuri faţă de actinomicina D. Antibioticul interferă cu procesul de transcriere ADN-ARN, deoarece se leagă cu mare afinitate de ADN şi stopează funcţia ARN-polimerazei. In celulele infectate cu ribovirusuri obişnuite, actinomicina D blochează sinteza ARN celular, dar nu modifică sinteza ARN viral. In celulele infectate cu retravirusuri, actinomicina D inhibă complet sinteza ARN (celular şi viral) şi în consecinţă, inhibă multiplicarea virală, ceea ce reflectă dependenţa replicării şi transcrierii ARN de un intermediar ADN.

Fiecare virion conţine una sau mai multe molecule de RT. Activitatea catalitică a RT s-a evidenţiat după permeabilizarea virionilor cu detergent neionic şi incubare în tampon cu dezoxinucleotid-trifosfaţi, unul fiind marcat radioactiv. Se sintetizează ADN complementar (ADNc), dar reacţia este blocată în prezenţa actinomicinei D.

Revers-transcriptaza este multifuncţională:

- sintetizează o catenă de ADN, complementară faţă de catena ARN a genomică, pe care o utilizează ca matriţă. De aceea, enzima a fost denumită ADN-polimerază dependentă de ARN. Enzima utilizează ca matriţă, nu numai o moleculă de ARN, ci şi o catenă de ADN;
- are acţiune RN-azică (RN-aza H) şi degradează catena ARN din hibridul ARN-ADN, lăsând un oligoribonucleotid ca primer pentru sinteza celei de a II-a catene de ADN;
- utilizează ca matriţă, catena de ADN de polaritate negativă şi catalizează sinteza catenei de polaritate pozitivă.

Activitatea RT este dependentă de un ARN iniţiator (primer), adică enzima alungeşte molecule de acizi nucleici, dar nu poate iniţia sinteza *de novo*. Sinteza ADN se face în direcţia 5'-3'. Pentru sinteza catenei de ADN de polaritate negativă, rolul de primer îl are ARNt asociat genomului viral, iar pentru sinteza catenei de polaritate pozitivă rolul de primer revine catenei de ARN genomic clivată la nivelul secvenţei PP, sub acţiunea RN-azei H.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

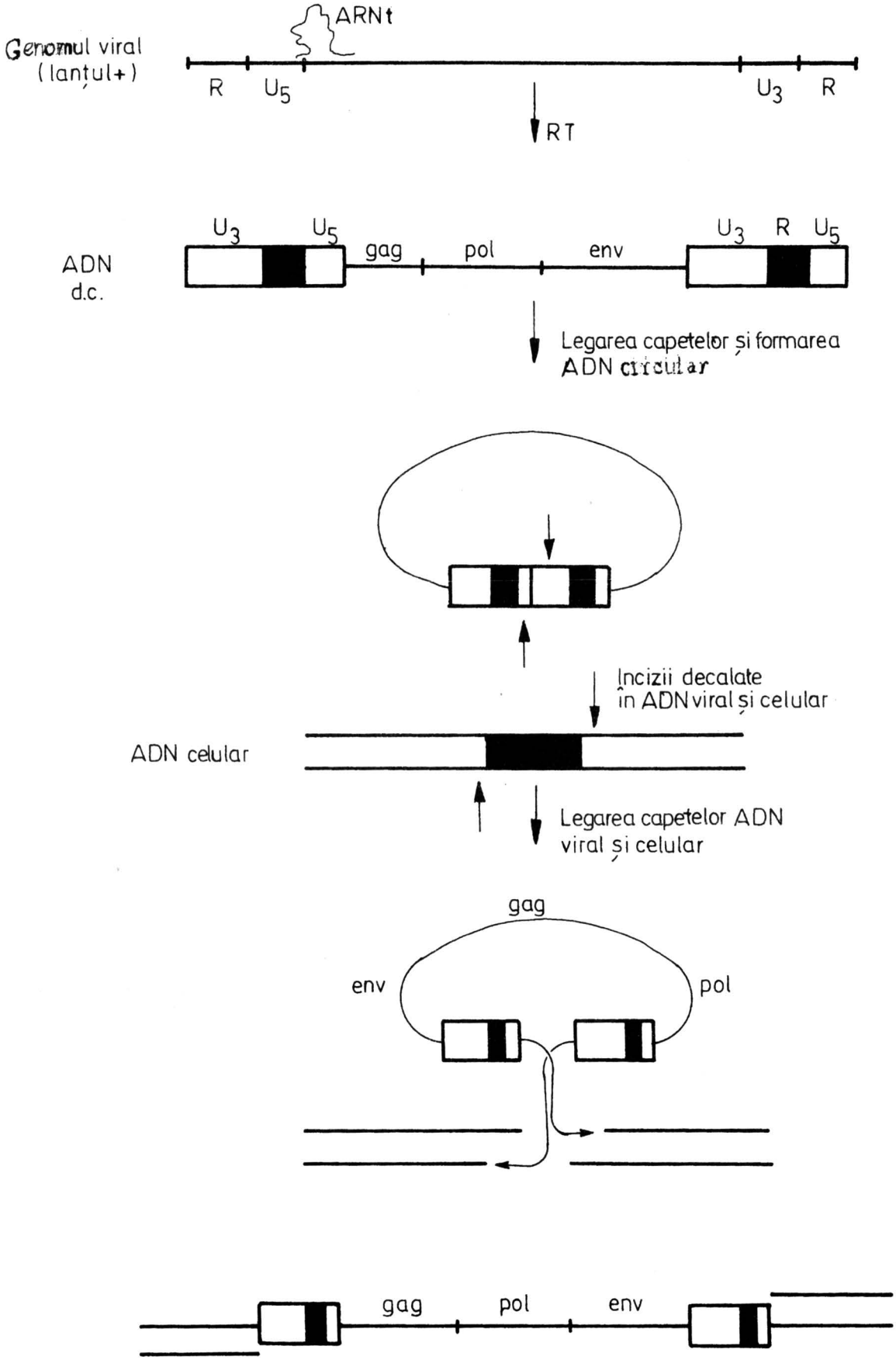


Fig. 163. Ilustrarea schematică a mecanismului molecular al integrării ADN viral, într-un cromosom al celulei (după Coffin, 1991).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La fiecare capăt al moleculei de ADN, se sintetizează câte o copie suplimentară a secvenţei R, astfel încât aceasta se dublează ca mărime. Ele formează LTR, care flanchează dubla catenă de ADN.

Sinteza ADN pare a avea loc în interiorul nucleocapsidei, în citoplasmă, în primele 4-8 ore după infecţie. Produsul sintezei este o *moleculă de ADN* linear. In această configuraţie, molecula este transportată în nucleu. Aici, capetele ei sunt reunite sub acţiunea unei ligaze de origine celulară. Se formează astfel, o moleculă de ADN dublu catenară, circulară, închisă covalent.

Integrarea moleculei de ADN viral, în ADN celular este un proces unic, caracteristic ciclului de replicare a retravirusurilor. Integraza de origine virală, taie cele cele două catene ale ADN viral, la secvenţe specifice, dar şi catenele de ADN cromosomal celular. Ligazele celulare leagă şi repară capetele celor două molecule de ADN. ADN viral, după integrare devine *provirus*.

Integrarea are o specificitate înaltă, adică totdeauna aceleaşi secvenţe ale ADN viral se găsesc în asociaţie cu ADN celular. Din punctul de vedere al situsului cromosomal, integrarea este mai puţin specifică. Există tendinţa ca integrarea să aibă loc la situsuri cromosomale transcrise activ, a caror structură cromatică este laxă.

Provirusul ADN integrat este stabil. Nu există mecanisme de excizie, de replicare independentă de cromosom, sau de translocaţie de la un situs la altul.

Replicarea genomului viral integrat se face prin mecanismul *transcrierii ADN proviral*, în ARN. Transcrierea este catalizată de ARN-polimeraza II celulară, aceiaşi care catalizează transcrierea ARNm celular.

Provirusul ADN funcţionează ca o singură unitate cistronică şi este transcris într-o singură moleculă de ARN. Prelucrarea ulterioară a copiilor în ARN genomic sau în ARNm este catalizată de enzimele celulare.

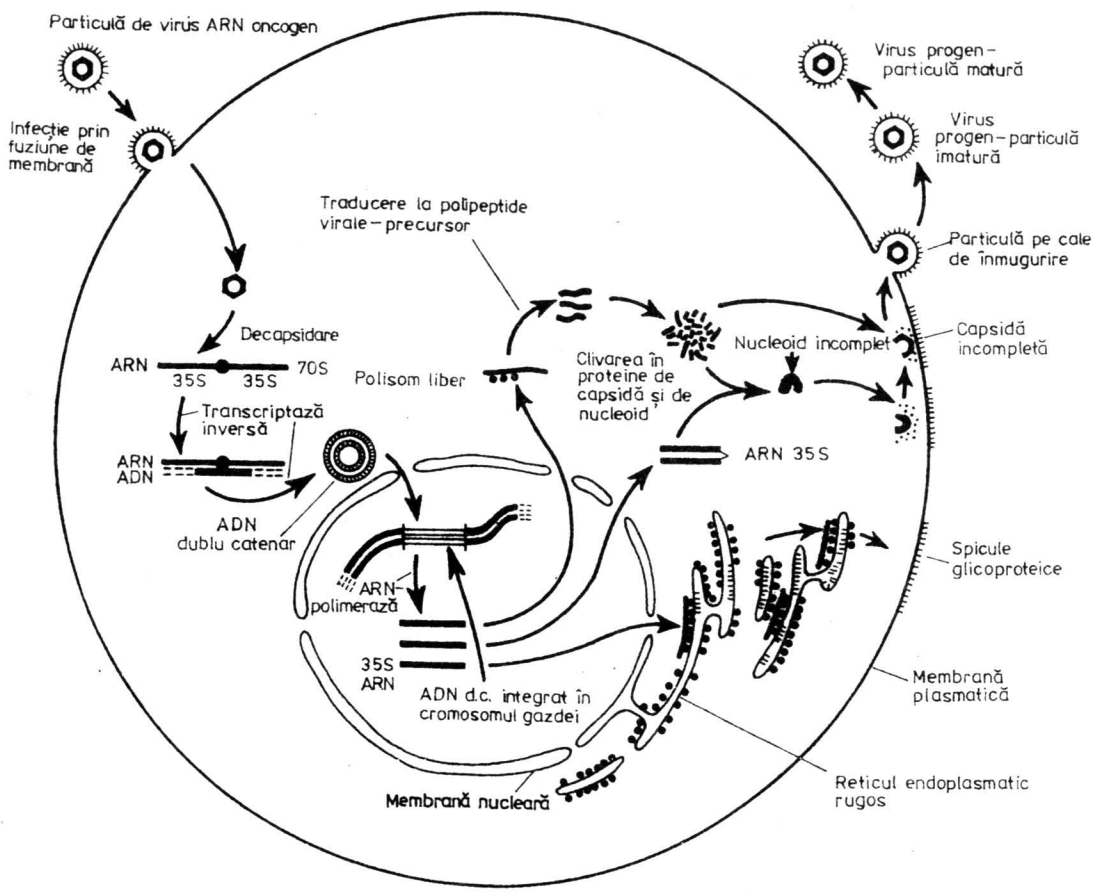


Fig. 164. Reprezentarea schematică a principalelor etape ale ciclului de replicare a virusurilor tumorale ARN.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O parte din copiile de ARN sunt prelucrate în nucleu prin poliadenilare şi rezultă ARN genomic. Restul copiilor sunt clivate şi înădite şi vor genera ARNm pentru sinteza proteinelor virale (*gag, gag-pro-pol, env*) în diferite combinaţii cantitative. Proteinele *gag, pro, pol* se sintetizează la nivelul polisomilor liberi, iar glicoproteina *env*, pe poliribosomii asociaţi reticulului endoplasmic neted.

Proteina *env* este sintetizată cu o secvenţă leader, care este clivată în cisternele reticulului endoplasmic. Glicozilarea se face în cisternele golgiene. Tot aici, molecula este clivată în unităţile *SU* şi *TM*, sub acţiunea unei enzime celulare. In absenţa clivajului, virionii nu sunt infecţioşi. Cele două proteine se inseră pe faţa externă a membranei citoplasmatice.

Asamblarea şi înmugurirea sunt procese simultane la majoritatea retravirusurilor şi sunt asociate cu membrana citoplasmatică. Cea mai mare parte a proteinei *gag*, neclivată, rămâne în citoplasmă şi intră în alcătuirea virionului ca proteină matriceală.

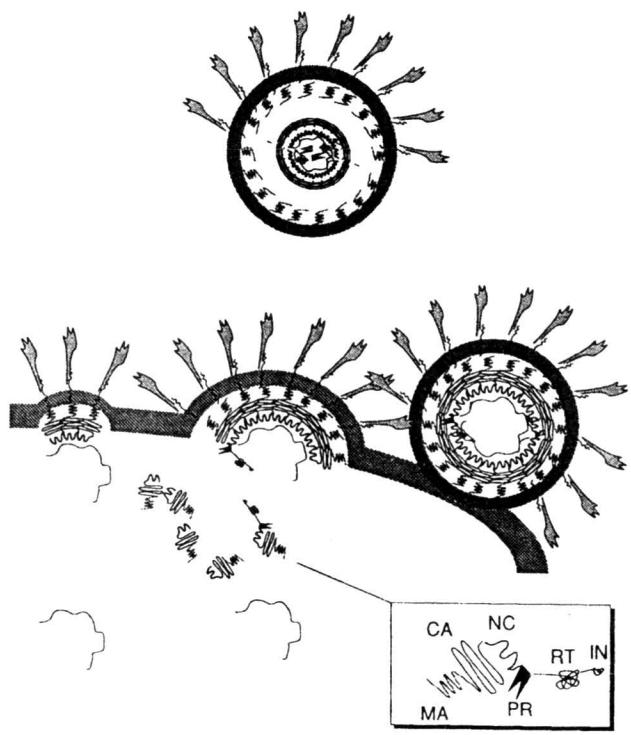


Fig. 165. Asamblarea particulelor retravirale de tip C. Clivarea glicoproteinelor de înveliș și asamblarea genomului se produc numai în zonele de înmugurire (după Coffin, 1991).

Proteinele regiunii centrale a virionului (*NC, RT, IN, PR*) se asociază cu ARN genomic şi formează nucleocapsida, care la rândul ei recunoaşte specific proteina *env* (*SU* şi *TM*) inserată în membrana şi concomitent are loc înmugurirea.

Multiplicarea virusurilor oncogene nu interferă cu procesele vitale ale celulei. Celulele infectate nu mor. Ele sunt transformate malign, se divid şi concomitent produc virus progen. Este o *transformare productivă*.

Proprietăţile noi dobândite după infecţia cu retravirusuri (starea malignă şi producerea de virus), se transmit generaţiilor succesive de celule, prin intermediul provirusului. Integrarea ADN viral este baza genetică a permanenţei infecţiei cu retravirusuri.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

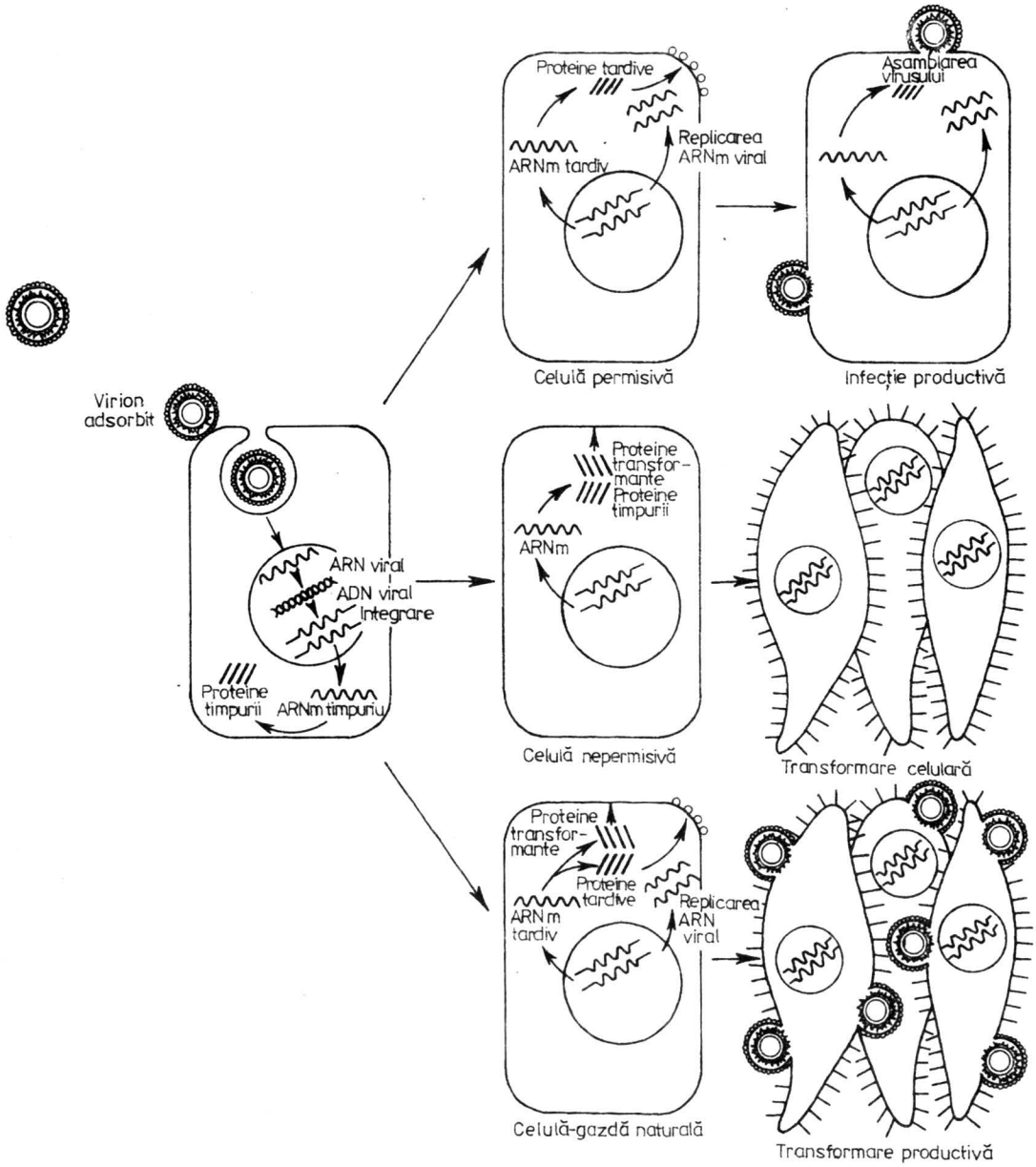


Fig. 166. Posibilitățile de evoluție a unei infecții cu un retravirus, în funcție de natura celulei gazdă: celulele permisive sunt infectate productiv (sus); celulele nepermisive sunt transformate malign, fără asamblarea virusului progen (mijloc); celulele gazdă sunt transformate productiv (jos) (după Johnson, 1982).

Virusul imunodeficienței umane dobândite (HIV)

HIV face parte din familia *Lentivirinae* Unul dintre primele virusuri identificate a fost un lentivirus (virusul anemiei infecțioase equine, 1904), agentul anemiei hemolitice autoimune a calului.

Primul retravirus infecțios pentru organismul uman, a fost izolat de R. Gallo (1980) și la denumit *HTLV* (*H*uman *T L*ymphotropic *V*irus), datorită tropismului sau față de limfocitele T mature, agentul cauzator al leucemiei celulelor T. S-au identificat două variante serologice ale virusului leucemiei limfocitelor T: HTLV I și HTLV II.

Virusul imunodeficienței dobândite umane are un tropism foarte bine exprimat pentru limfocitele Th și din acest motiv R. Gallo (1982) l-a denumit HTLV III. Denumirea de HIV a fost dată de comitetul International pentru Nomenclatura Virusurilor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

HIV se multiplică în mononuclearele periferice, în limfocitele T_{CD4}, pe care le lizează, dar nu le transformă. S-au identificat două variante serologice (subtipuri) de HIV, HIV 1 şi HIV 2. Ele au tendinţa să infecteze neproductiv celulele sensibile. Se multiplică, în special în celulele liniei *macrofag*, dar în ceea ce priveşte spectrul celulelor gazdă sunt *pantrope*. Pentru infecţia productivă sunt dependente de factori celulari.

In funcţie de specificitatea lor antigenică, există mai multe linii de HIV, toate aparţinând lui HIV 1 şi HIV 2. HIV 1 produce imunodeficienţe severe, iar HIV 2 produce infecţii cu efecte patologice mai atenuate în sfera imunitară şi este predominant în Africa de Vest. Se pare că există linii de HIV care nu produc manifestări clinice.

Organizarea structurală şi ciclul de multiplicare a HIV sunt asemănătoare cu cele descrise pentru alte retravirusururi.

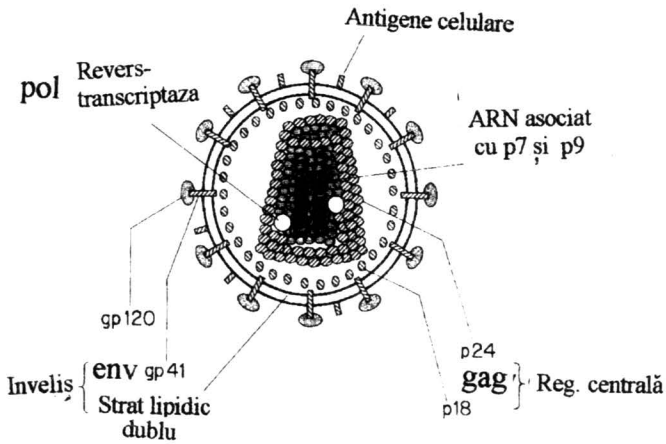


Fig. 167. Reprezentarea schematică a structurii virusului imunodeficienţei umane dobândite (HIV) (după Folks, 1998).

Interacţiunea HIV cu celulele sensibile este mediată de moleculele CD_4. Cele mai sensibile sunt limfocitele Th (CD_{4+}), dar sunt permisive şi macrofagele, monocitul circulant, megacariocitul, celulele NK, eozinofilele, celulele epiteliului timic, celulele dendritice.

Limfocitele B sunt foarte sensibile dacă au fost infectate cu virusul Epstein-Barr. In tegument, fibroblastele şi celulele Langerhans par a fi infectate. Virusul pătrunde în celulă şi pe calea altor receptori: receptorul pentru Fc şi receptorul pentru C_3.

Dovada directă a interacţiunii HIV cu receptorul CD_4 a fost adusă exprimental: transfecţia fibroblastelor umane cu genă codificatoare a glicoproteinei CD_4, le-a conferit sensibilitate la infecţia cu HIV. După ce virionul se leagă specific de receptorul său, se produce fuziunea învelişului viral cu membrana citoplasmatică. Afinitatea virusului pentru receptorul celular este foarte înaltă: de exemplu, moleculele solubile de CD_4 pot să inhibe competitiv infecţia cu HIV.

Infecţia cu HIV a limfocitelor T mature dar neangajate (adică nu au experienţa anterioară a contactului cu antigenul şi nu se divid), este abortivă, dar celulele T de memorie (angajate) sunt permisive şi infecţia este productivă.

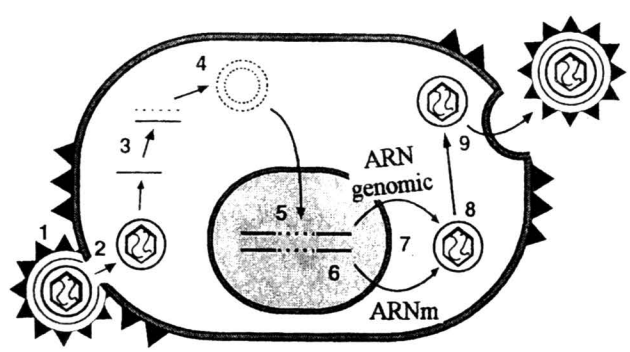


Fig. 168. Ciclul infecţios al HIV. În treptele 3-5, proteinele regiunii centrale sunt asociate cu genomul. Liniile întregi simbolizează catena de ARN, iar cele întrerupte, pe cele de ADN. Moleculele ADN dublu catenare legate covalent se integrează în cromosomul celulei. Terapia antivirală este orientată faţă de oricare din treptele care pot întrerupe cilcul replicării şi diseminarea virusului. 1 = ataşarea şi fuziunea; 2 = dezvelirea şi pătrunderea nucleocapsidei; 3 = reverstranscrierea; 4 = sinteza ADNc; 5 = integrarea; 6 = transcrierea ARNm; 7 = traducerea; 8 = asamblarea regiunii centrale a virionului; 9 = asamblarea finală şi înmugurirea.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Genomul este organizat şi funcţionează după mecanismele comune tuturor retravirusurilor.

Ciclul de multiplicare a HIV este complicat de acţiunea reglatoare a unor produse genice suplimentare. Cele mai timpurii molecule de ARNm au greutate moleculară mică şi codifică proteine cu rol de reglare a transcrierii şi post-transcrierii. Copiile de ARN de dimensiuni mici, rezultă prin prin procese de clivare multiplă. Ele sunt transcrise timpuriu în ciclul replicării şi reglează, prin proteinele codificate, cantitatea de ARNm şi ARN genomic, precum şi transportul ARNm în citoplasmă.

Expresia genelor reglatoare este dependentă de starea fiziologică a celulei gazdă. De exemplu, în limfocitele T_{CD4} neangajate, infecţia este abortivă.

Genele HIV reglatoare ale replicării – *tat, rev, nef, vpr* etc., codifică factori care modulează interacţiunea virusului cu substratul celular. Transcrierea predominantă a uneia sau alteia dintre aceste gene, determină tipul de infecţie: productiv sau latent. Sinteza crescută a proteinei *Tat* stimulează sinteza proteinelor virale şi asamblarea virionilor progeni. Invers, exprimarea genei *nef* (sinteza proteinei *Nef*) favorizează latenţa infecţiei. *Rev* este o fosfoproteină nucleară ce se asociază cu ARN viral şi orientează transportul selectiv al ARN viral, genomic sau clivat (mesager) şi stimulează ciclul replicării virale.

Tipuri de relaţii virus-celulă

Utilizarea culturilor de celule a permis definirea mai multor tipuri de interacţiuni ale virusurilor cu celulele pe care le infectează, dominate de particularitatea unică a acestor entităţi infecţioase – *parazitismul absolut.*

După ce un virus infectează celula sensibilă, ansamblul rezultat constituie o unitate funcţională cu trăsături noi, distincte, care nu este suma aritmetică a celor două unităţi (celulă şi virus), ci un *complex viu,* a cărui funcţionalitate derivă din interacţiunea celor două genomuri. Uneori, genomul viral domină funcţionalitatea complexului, iar alteori informaţia genetică virală este dominată de programul genetic al celulei.

Modalităţile de evoluţie a complexului virus-celulă sunt următoarele:

- evoluţia (starea) *independentă*;
- evoluţia (starea) *dependentă* (sau interacţiunea de tip integrativ).

Starea independentă a celor două unităţi care interacţionează corespunde situaţiei în care genomul viral nu se supune mecanismelor reglatoare ale celulei. Multiplicarea virusului se realizează într-un ritm propriu, coordonat de genomul viral. Rezultatul interacţiunii este *infecţia virală productivă.*

Infecţia productivă defineşte interacţiunea în cursul căreia virusul infectant preia controlul proceselor de biosinteză celulară, deviind activităţile acesteia, de la sinteza constituienţilor proprii, în sensul biosintezei mai mult sau mai puţin exclusivă, de constituienţi virali. Informaţia genetică virală este exprimată integral, asigurând evoluţia întregului ciclu de multiplicare virală, asamblarea virionilor şi, în multe cazuri, moartea şi liza celulei cu eliberarea virusului progen (efect citocid).

Celulele care permit exprimarea integrală a mesajului genetic, multiplicarea şi eliberarea virusului sunt *permisive.* Permisivitatea este o proprietate datorată structurii lor genetice. Celulele permisive provin, de regulă, de la speciile pe care virusul le infectează în mod natural, deşi există numeroase excepţii (de exemplu, ortho- şi paramixovirusurile se multiplică în oul embrionat de găină). Caracterul "permisiv" şi respectiv "nepermisiv" este, cel puţin uneori, controlat genetic şi este influenţat de gradul de *diferenţiere* celulară. Celulele embrionare sunt mai permisive. Celulele semipermisive permit replicarea virală, dar cu o rată mai mică. Degenerarea celulei şi liza, dacă se produc, apar într-un interval mai îndelungat decât al celulei permisive.

Starea independentă a genomului viral faţă de celulă se poate manifesta sub două forme:

a) a sistemului independent citocid

b) a sistemului independent echilibrat, care corespunde unei evoluţii moderate a interacţiunii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sistemul independent citocid corespunde relaţiei în care genomul viral se replică foarte activ. Celula este copleşită de rata înaltă a biosintezei componentelor virale şi de asamblarea virionilor progeni. Rezultatul este dezintegrarea celulei şi eliberarea virionilor progeni. Această interacţiune corepunde *infecţiei litice productive*.

Sistemul independent echilibrat caracterizează complexele furnizate de unele virusuri moderate, care persistă în celulă, dar nu inhibă biosintezele celulare. Genomul viral se replică autonom, dar cu o rată scăzută, care asigură persistenţa lui în celulă şi transmiterea de la o generaţie celulară la altă. Caracteristic este faptul ca genomul viral se păstrează în celulă, în stare fizic independentă, ca ADN episomal. Virusul determină o infecţie de lungă durată (infecţie *persistentă*).

Infecţiile *persistente* sunt produse de virusuri care se multiplică fără să producă modificări profunde ale metabolismului celular. Iniţial, infecţiile persistente au fost recunoscute numai *in vivo*, dar persistenţa virală se produce şi *in vitro*. In culturile celulare se recunosc două tipuri de infecţii persistente:

l) *Infecţiile echilibrate cronice* ("steady state infections", *steady*, engl. = stabil) corespund situaţiei în care, practic, toate celulele dintr-o cultură sunt infectate cu un *virus necitocid*, care este produs continuu, uneori foarte intens. Celulele rămân viabile, metabolic active şi continuă să se dividă, iar virusul este transmis celulelor fiice. Disfuncţiile celulei, deşi iniţial sunt minore pot duce în timp, la tulburări severe. Acest tip de infecţie a fost evidenţiat în celulele renale de maimuţă, aparent normale, contaminate cu SV_{40} sau cu SV_5 (un paramixovirus). În culturile de celule renale, SV_{40} se multiplică, dar celulele rămân viabile, eliberând cantităţi mari de virus în mediul extracelular.

Infecţia echilibrată, *in vitro* nu poate fi eliminată prin adăugarea anticorpilor neutralizanţi, deoarece nu există o fază de infecţie exogenă.

Starea de purtător ("carrier state") se datorează infecţiei produse de un *virus citocid*, a cărui multiplicare este limitată la un număr restrâns de celule permisive, dar majoritatea celulelor substratului sunt nepermisive. Persistenţa infecţiei este asigurată de transmiterea virusului progen la un număr mic de celule permisive ale culturii. Majoritatea celulelor culturii sunt nepermisive, datorită unor fenomene de rezistenţă intrinsecă sau datorită unor factori inhibitori (anticorpi, interferon) prezenţi în mediu. Spre deosebire de infecţia cronică echilibrată, starea de purtător de virus a unei culturi celulare poate fi "vindecată" (deoarece infecţia este exogenă), prin adăugarea anticorpilor antivirali neutralizanţi sau prin clonarea suspensiei celulare, la o densitate suficient de mică, pentru a permite izolarea celulelor individuale indemne.

Evoluţia dependentă sau interacţiunea de tip integrativ a fost recunoscută iniţial, pentru interacţiunea fagului lambda cu celulele de *Escherichia coli* K_{12}. Genomul viral se integrează în cromosomul bacterian, ca profag (provirus) şi persistă nu numai în celula infectată, ci se transmite descendenţilor ei. Amănuntele referitoare la interacţiunea de tip lizogen sunt prezentate în altă secţiune a acestui capitol.

Interacţiunea de tip integrativ caracterizează raportul dintre genomul virusurilor oncogene şi celulele animale sensibile. Uneori, rezultatul interacţiunii de tip integrativ este *transformarea malignă* (efect citochinetic) a celulei, consecinţă directă a modificărilor profunde a funcţiilor celulare. Celulele transformate malign pot să producă virus progen (transformare productivă), dar în alte cazuri, producerea virusului progen nu este detectabilă. Alteori, interacţiunea de tip integrativ nu are ca efect transformarea malignă, ci constituie mecanismul molecular obligatoriu al multiplicării virale (de exemplu, pentru retravirusurile neoncogene).

În concluzie, tipurile de interacţiuni dintre un virus şi un substrat celular sunt dependente atât de originea substratului celular, de stadiul fiziologic al celulelor, dar şi de virusul infectant.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

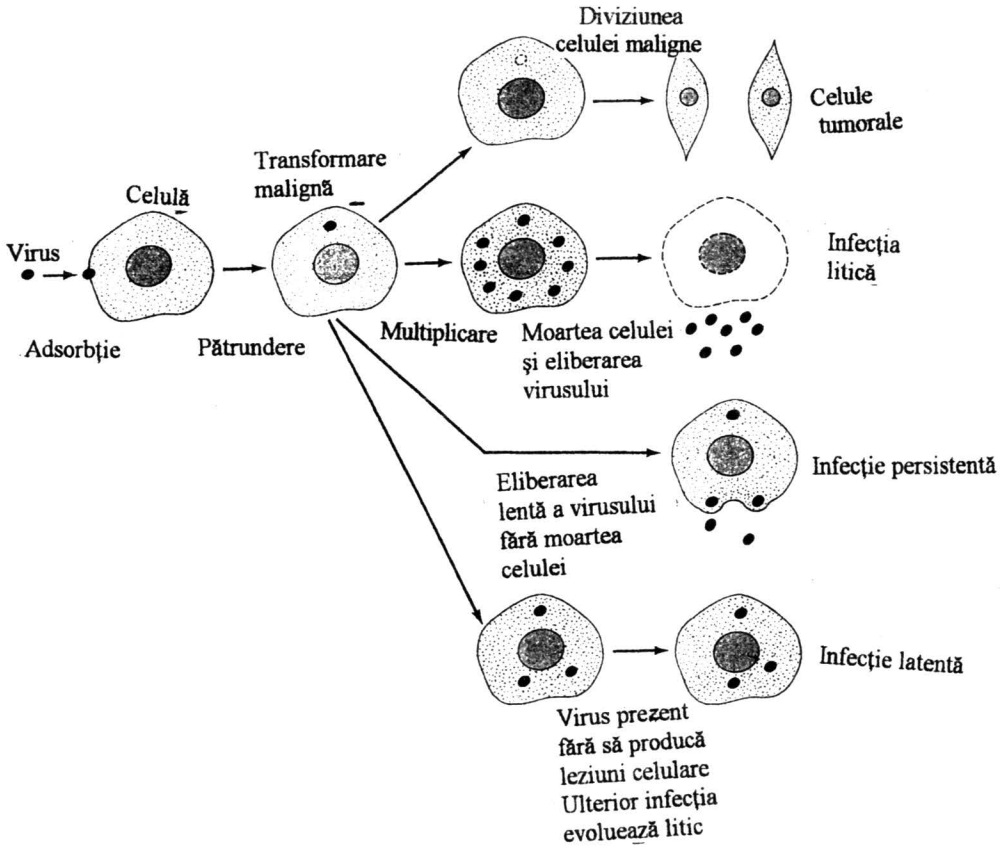


Fig. 169. Principalele tipuri de interacţiuni între virusuri şi celulele gazdă (după Brock, 1988).

Patologia celulelor infectate cu virusuri

Interacţiunea virus-celulă, produce modificări cu atât mai ample, cu cât gradul de sensibilitate a celulei este mai mare.

Intr-un substrat celular *permisiv,* infecţia virală productivă este de cele mai multe ori, asociată cu degenerare şi moarte celulară. Alteori, deşi virusul se multiplică, celula rămâne viabilă, cu alterări structurale şi funcţionale mai puţin ample produse de virus. Particularităţile funcţionale ale celulelor care condiţionează multiplicarea virală au fost denumite generic, *factori de replicare,* prin analogie cu factorii de creştere ai celulei bacteriene.

In substratul celular *nepermisiv,* infecţia cu dezoxiribovirusuri nu produce virus progen, dar cu o frecvenţă redusă, apare *transformarea malignă,* cu modificări caracteristice proliferative (efect citochinetic).

Orice tip de leziune celulară indusă de virus, fie că are o expresie *morfologică,* fie numai una *biochimică,* poartă denumirea de efect *citopatogen.* Noţiunea include nu numai efectul litic produs de virusurile citocide, ci şi toate celelalte modificări compatibile cu supravieţuirea, după infecţia cu un virus. Frecvent termenul de *efect citopatogen* este folosit în sens strict pentru a descrie exclusiv leziunile morfologice, deoarece sunt mai uşor de evidenţiat. In realitate, modificările morfologice sunt expresia celor biochimice (metabolice), deşi intensitatea lor nu este totdeauna corelată direct.

Efectele citopatogene au adeseori, un caracter specific şi se însoţesc de apariţia unor modificări caracteristice (apariţia incluziilor virale), care au un caracter aproape patognomonic şi pot fi utilizate pentru a preciza natura virusului infectant. Cele mai evidente efecte citopatogene sunt de tip *citotoxic, citocid şi citochinetic.*

Efectul *citotoxic* hiperacut este cauza morţii celulare, înainte de multiplicarea virală, fără producerea de virus progen. Moartea celulară este rezultatul unui efect toxic al proteinelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

capsidale, consecutiv infecţiei experimentale a culturilor celulare cu un inocul masiv. Un astfel de efect este produs de proteina pentonică a adenovirusurilor, asupra substratului celular.

Efectul *citocid* este rezultatul infecţiei celulelor sensibile cu virusuri citolitice şi se datorează leziunilor progresive, care duc la alterarea profundă a activităţilor metabolice şi a unor structuri celulare determinând, în fazele tardive ale ciclului infecţios, moartea celulei şi eliberarea virionilor. Celulele cultivate în monostrat se desprind de suport şi manifestă alterări majore : rotunjire, vacuolizare, ratatinare (constricţie celulară), pierderea afinităţii pentru coloranţii vitali (albastru triptan, roşu neutru), ceea ce permite identificarea şi diferenţierea lor de celulele vii.

Mecanismele moleculare ale interacţiunii virus-celulă. Efectul citopatic(ECP).

Bazele moleculare ale ECP se cunosc într-o măsură limitată. Efectul citopatic este consecinţa acţiunii mai multor mecanisme distincte. Intr-un complex virus-celulă, este predominant unul din mecanismele prezentate mai jos. Mecanismul ECP este specific virusului infectant.

ECP este consecinţa parazitismului absolut al virusurilor şi a eficienţei lor de a subordona activitatea metabolică a celulei şi de a o orienta în sensul sintezei macromoleculelor cu specificitate virală. O singură copie a genomului viral, iniţiază programul de dominanţă asupra programului celular, de $10^4 - 10^6$ ori mai mare, care este deja exprimat.

Interacţiunea citolitică produce inhibiţia sintezei macromoleculelor specifice celulei, denumită şi "efect de întrerupere". In absenţa sintezelor specifice, care să înlocuiască moleculele uzate, apar modificări funcţionale şi structurale incompatibile cu viaţa.

1. Modificări metabolice.

Pentru a domina metabolismul celular, virusurile au elaborat o serie de mecanisme strategice, care în esenţă, constau în următoarele :

- schimbări în metabolismul intermediar, în special al dezoxiribonucleotidelor ;
- modificări ale sintezei, prelucrării, transportului şi turnover-ului macromoleculelor celulare ;
- intensificarea exprimării genelor virale şi interferenţa cu programul celular.

Multe din aceste modificări sunt nefavorabile pentru celulă, dar de obicei, virusul nu omoară celula înainte de desfăşurarea ciclului de replicare.

Modificări ale metabolismului ADN

Replicarea ADN celular are loc în faza S a ciclului şi necesită dezoxiribonucleotide, enzime de replicare, sinteza proteică. Virusurile perturbă acest proces în diferite grade, în funcţie de mecanismele lor de replicare. De exemplu, retravirusurile se integrează în cromosomii celulei şi prin exprimarea oncogenelor, stimulează desfăşurarea ciclului celular, dar nu afectează replicarea ADN celular. La celălalt capăt al spectrului, sunt virusurile herpes şi pox, a căror replicare are un grad înalt de autonomie. Progresia celulei spre faza S este blocată şi se produce chiar degradarea ADN.

Biosinteza dezoxiribonucleotidelor. Sinteza ARN şi a proteinelor are loc tot timpul vieţii, în majoritatea celulelor, dar în cele diferenţiate terminal, sinteza ADN şi diviziunea încetează. Pentru ca un virus să se multiplice în celulele diferenţiate (de exemplu în neuroni) trebuie să depăşească condiţiile de supresie, adică să furnizeze enzimele necesare replicării ADN şi să asigure o cantitate suficientă de dezoxiribonucleotid – trifosfaţi (dNTP). Uneori, chiar celulele care se divid nu pot oferi cantităţile de dNTP impuse de sinteza ADN viral, ceea ce impune un aport suplimentar. Pentru poxvirusuri, cu sediul de replicare în citoplasmă, suplimentarea cu dNTP este obligatorie.

Această restricţie este depăşită prin două mecanisme :

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Această restricţie este depăşită prin două mecanisme :

- virusurile cu genom mic şi mediu (papova, adeno-) induc *intrarea celulei în faza S*. Se exprimă genele pentru sinteza enzimelor necesare. Activarea genelor reglatoare ale diviziunii, stă la baza potenţialului oncogen al acestor virusuri;

- virusurile cu genom mare (herpes, pox), *codifică enzimele* de metabolism ale nucleotidelor. Genele virale pentru aceste enzime au fost probabil dobândite din celulă. Ele nu funcţionează, dacă virusul infectează şi se replică în celule metabolic active, dar conferă independenţa replicării virale de faza S a ciclului celular. Enzimele virale catalizează aceleaşi reacţii ca şi omologele lor celulare, dar specificitatea de substrat şi mecanismele de reglare sunt diferite, ceea ce le face ţinte pentru agenţii antivirali. De exemplu, acyclovir şi gancyclovir, analogi ai guanozinei, pot fi fosforilate de timidin-kinaza (Tk) a herpesvirusului, dar nu de Tk a celulei.

Replicarea ADN. Virusurile mici stimulează sinteza enzimelor necesare replicării ADN celular în faza S. Antigenul T de 94 kD, codificat de SV_{40} se leagă de o proteină supresoare a diviziunii celulare şi a replicării ADN – proteina p53 - şi astfel se elimină efectul sau inhibitor. Exprimarea unei singure gene virale pregăteşte celula pentru replicarea ADN.

Virusurile cu genom mai mare (*adeno*) codifică trei proteine pentru replicarea ADN: o ADN-polimerază, o proteină legată terminal de genom cu rol de iniţiere a sintezei ADN viral şi o proteină care se asociază cu ADN monocatenar. Herpesvirusurile codifică 7 proteine cu rol în replicarea ADN, ceea ce le conferă independenţa de ciclul celular şi le permite să se replice chiar în neuroni, în cursul infecţiilor persistente latente.

Inhibiţia sintezei ADN celular este consecinţa unor modificări induse în starea fizică a ADN, incompatibile cu funcţia da transcriere, ceea ce determină inhibiţia sintezei macromoleculelor specifice celulei. Matricea nucleară este substratul fizic pentru cromatină, dar şi pentru procesele de transcriere şi replicare a ADN.

Unele molecule virale se asociază cu matricea nucleară şi modifică distribuţia ADN în nucleu. De exemplu, în celulele infectate cu virusuri herpetice, ADN este deplasat din punctele de inserţie pe matricea nucleară, iar după infecţia cu adenovirusuri, efectul este invers, de *marginaţie* a cromatinei (deplasarea şi aglomerarea ei spre periferia nucleului, în blocuri heterocromatice). Virusurile pox codifică o DN-ază, ce pătrunde în nucleul celulei şi depolimerizează ADN monocatenar, despiralizat pentru replicare sau pentru transcriere.

Ca răspuns la infecţia cu unele virusuri, celulele suferă fenomenul de *apoptoză*, în cursul căreia se produce clivajul internucleosomal al cromatinei.

Modificări ale metabolismului ARN

Pentru sinteza proteinelor virale, este totdeauna necesară sinteza ARNm cu specificitate virală. Experienţele de hibridare ARN-ADN au evidenţiat pentru prima dată existenţa fenomenelor de clivare şi înădire a secvenţelor genice informaţionale (introni).

Pentru transcrierea eficientă a genelor proprii, virusurile au elaborat mai multe mecanisme:

- trecerea ARN-polimerazei II celulare sub controlul unui promotor viral foarte activ. De exemplu, promotorul lui SV_{40} orientează ARN-polimeraza II celulară să transcrie gena pentru sinteza antigenului T;

- existenţa unui factor viral al transcrierii care orientează ARN-polimeraza II spre ADN viral. La herpesvirusuri, ADN viral este asociat cu o proteină structurală, care transcrie programul timpuriu. Două dintre proteinele programului timpuriu, schimbă specificitatea ARN-polimerazei II celulare, care va transcrie programul tardiv;

- existenţa unei ARN-polimeraze cu acţiune specifică faţă de genomul viral: poxvirusurile şi toate ribovirusurile cu catenă de polaritate negativă sau cu genom dublu catenar au ARN-polimerază proprie;

- perturbarea metabolismului celular se produce la orice treaptă: transcriere, prelucrare, transportul din nucleu spre citoplasmă, traducere, sau modificarea ratei degradării. Toate conferă ARN viral un avantaj competitiv prin următoarele mecanisme:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1) Sinteza ARN celular este inhibată de cele mai multe virusuri neoncogene, datorită inhibiţiei sintezei proteice. Scade astfel competiţia pentru ribonucleozid-trifosfaţi. Virusul gripal inhibă sinteza ARN celular, prin clivajul catalizat de proteina NS_1 virală, care îndepărtează un fragment de 10-13 nucleotide de la capătul 5' al ARNm celulari. Fragmentele sunt folosite ca primeri pentru iniţierea ARNm virali în nucleul celulei infectate, dată fiind incapacitatea ARN-polimerazei virale de a iniţia sinteza moleculelor de ARN. Efectul este transferul secvenţei de bonetare de la ARNm celulari la mesagerii virali, făcându-i nefuncţionali pe primii şi asigurând traducerea celor virali.

2) Prelucrarea ARN şi transportul nucleo-citoplasmatic este un punct de control pentru virusurile ce se replică în nucleu. Virusurile cu genom mic înădesc copiile primare în câteva moduri, atât pentru a genera ARNm multipli de la un singur promotor, cât şi pentru accesul la două cadre de citire suprapuse în aceiaşi secvenţă a genomului viral. Proteina NS_1 a virusului influenza, blochează înădirea ARNm celular, prin legarea de cozile poli-A. Copiile de ARN celular neînădite sunt reţinute în nucleu şi constituie sursa de oligonucleotide necesare ca primeri pentru transcrierea mesagerilor virali. La adenovirusuri, două din proteirele programului timpuriu inhibă transferul ARNm celular din nucleu şi favorizează transferul ARNm viral tardiv. Astfel, se sintetizează preferenţial proteine specific virale.

3) Controlul degradării ARNm în celula eucariotă este puţin înţeles. Virusurile herpetice şi virusul vaccinal măresc rata degradării ARNm celular şi inhibă sinteza proteinelor celulare. Creşterea ratei degradării nu este specifică ARNm celular, deoarece ARNm virali sunt supuşi aceluiaşi proces, dar rata superioară a transcrierii ARNm virali compensează pierderea prin degradare.

Modificări ale metabolismului proteinelor

Sinteza, prelucrarea şi transportul proteinelor virale constituie domeniul de intersecţie a funcţiilor celulare şi virale. Majoritatea virusurilor codifică enzime specifice sau factori ce catalizează transcrierea şi replicarea genomului viral, dar atât celula cât şi virusul sunt dependente de aparatul celular de sinteză şi transport proteic. De aceea, etapa traducerii nu poate fi ţinta medicaţiei antivirale. Metabolismul proteinelor, în celula infectată este modificat prin mai multe mecanisme.

a) După infecţia virală, *inhibiţia sintezei proteinelor celulare* este una din consecinţele cele mai evidente. Mecanismele întreruperii sintezei proteice sunt diferite. Virusurile citocide (polio, herpes, adeno, vaccinal) inhibă profund traducerea mesagerilor celulari, iar retravirusurile produc perturbări minime. Intre cele două extreme se situează raporturile celorlalte virusuri cu substratul în care se multiplică. ARNm viral şi celular intră în competiţie directă pentru traducere. Traducerea ARNm viral este favorizată prin mecanisme necunoscute. Aproape totdeauna, în celula infectată se sintetizează o cantitate totală de proteine, mai mică decât în celula normală, deoarece, în general, infecţia diminuă capacitatea de sinteză proteică. Mecanismul discriminării între ARNm celular şi ARNm viral nu se cunoaşte, dar a fost dedus din faptul că inhibiţia sintezei proteinelor celulare este prea rapidă pentru a fi atribuită numai scăderii cantitative a ARNm sau inhibiţiei sintezei sale (herpes, vaccinal, rinovirus).

b)In celulele infectate cu virusul polio, se produce *dezagregarea selectivă a polisomilor celulari.* Ribosomii rămân funcţionali şi disponibili pentru sinteza proteinelor virale. Pe măsură ce sinteza proteinelor virale devine detectabilă, apare o nouă clasă de polisomi, de dimensiuni mai mari, corespunzatoare ARNm viral, care este mai mare decât dimensiunea medie a ARNm celular.

2. Alterarea funcţiilor normale ale membranelor celulare

Virusurile alterează membrana celulei gazdă, pe două căi:
- modificarea permeabilităţii membranei citoplasmatice;
- favorizarea fuziunii membranei cu celulele învecinate.

Ambele procese sunt rezultatul diminuării sau stopării biosintezelor proprii celulei, precum şi al înlocuirii proteinelor celulare membranare, cu glicoproteine ale peplosului viral.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Astfel se pierde capacitatea de a menţine echilibrul mediului ionic intracelular. Concomitent, diminuă rata transportului nutrienţilor esenţiali în celulă şi a eliminării produşilor de catabolism.

Cele mai evidente modificări ale membranei citoplasmatice sunt detectabile la celulele infectate cu virusuri învelite (herpes, mixo-, paramixovirusuri). Celulele au frecvent tendinţa de a fuziona, producând uneori sinciţii gigante, sub forma unor mase de citoplasmă, delimitate de o membrană, care pot include zeci sau chiar sute de nuclei.

Procesul fuziunii celulare poate fi indus de proteinele învelişului viral, în special în cazul în care învelişul conţine proteine de origine celulară. Fuziunea este produsă de virusul infectant (fuziune din exterior) şi a fost studiată în culturi de celule infectate cu virusul Sendai (un paramixovirus), care acţionează cu mare eficienţă ca agent fuzionant. Sinciţiile se lizează, consecutiv multiplicării virale. După iradiere, virusul îşi pierde capacitatea de replicare, dar şi-o păstrează pe cea hemaglutinantă şi fuzionantă. De aceea, etapele procesului de fuziune celulară au fost studiate prin interacţiunea virusului inactivat prin iradiere, cu substratul celular. Un virion aflat în asociere strânsă cu membranele a două celule, formează o punte membranară ce se extinde treptat, rezultatul fiind fuziunea completă a celor două celule.

Principiul fuzionant al învelişului paramixovirusurilor, este o proteină specifică polifuncţională (proteina "F"), implicată în iniţierea procesului infecţios, prin fuziunea învelişului viral cu membrana celulei sensibile, în hemoliza virală şi în fuziunea celulară. Proteina F îşi exercită efectul fuzionant, numai dacă este inclavată în dublul strat lipidic al învelişului viral şi dacă este menţinută în contact strâns cu membrana celulară, prin intermediul hemaglutininelor.

Fuziunea "din exterior" se produce numai după expunerea celulelor sensibile la doze mari de virioni infecţioşi sau inactivaţi (câteva mii de particule/celulă).

Infecţia naturală se face totdeauna cu un număr mic de virioni şi fuziunea este tardivă, după desfăşurarea ciclului de replicare. Fuziunea este rezultatul sintezei glicoproteinelor virale în celula infectată, care, migrând la nivelul membranei, induc fuziunea cu celulele vecine. Este aşa numita "fuziune din exterior", a cărei consecinţă este formarea *sinciţiilor* sau *policariocitelor*. Efectul fuzionant este foarte evident la *Paramyxovirus* şi *Pneumovirus* (virusul respirator sinciţial).

Scăderea rezistenţei *membranelor lizosomale* are drept urmare, eliberarea enzimelor hidrolitice în citoplasmă şi, prin aceasta, intensificarea efectului citopatogen. In celula animală, modificările membranelor lizosomale evoluează în două etape: a)creşterea permeabilităţii membranelor lizosomale (cu păstrarea conţinutului enzimatic); b)difuzia enzimelor lizosomale în citoplasmă şi adsorbţia lor secundară în nucleul celulei infectate, asociată cu modificări morfologice (rotunjirea celulei) şi pierderea afinităţii pentru coloranţii vitali.

3. Modificări ale citoscheletului

Citoscheletul are rol structural, de transport şi de mobilizare a organitelor. După infecţia virală, frecvent se produce ruperea unuia sau mai multor sisteme de fibre ale citoscheletului, în special a microfilamentelor de actină. După infecţie, matricea nucleară de dezorganizează, iar efectul se manifestă în redistribuirea cromatinei.

4. Apariţia corpilor de incluziune

Corpii de incluziune sunt structuri celulare neoformate sub influenţa infecţiei, în masa cărora se acumulează componente virale. Prin localizare, ele reflectă situsul replicării virale.

Incluziunile virale au proprietăţi tinctoriale noi. După formă, pot fi sferice, ovalare, piriforme sau nedefinite, în funcţie de virusul infectant. Dimensiunile lor sunt cuprinse între 1 şi 30 μm, ceea ce le face vizibile la microscopul optic. Unice sau multiple, ele sunt dispuse în *citoplasmă* (în celulele infectate cu poxvirusuri, ribovirusuri), *în nucleu* (în celulele infectate cu dezoxiribovirusuri) sau au localizare *mixtă* (în celulele infectate cu orthomixovirusuri). Unele incluziuni sunt mai cunoscute după numele autorilor care le-au descris: corpii Babeş-Negri (virusul rabic), corpii Guarnieri (virusul vaccinal), incluziunile Cowdry (virusul herpes).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Semnificaţia biologică a incluziunilor virale este evidentă şi din faptul că ele se dezvoltă pe măsura progresiei ciclului de multiplicare. Incluziunile sunt markeri structurali ai procesului dinamic prin care celula produce virus. Ele reprezintă, în general, "fabricile de virus" în care are loc sinteza componentelor virale (acizi nucleici, proteine) şi are loc morfogeneza virionilor.

În fazele tardive ale infecţiei, ca şi după aceea, incluziunile sunt lipsite de virus infecţios, dar prin specificitatea şi localizarea lor, indică sediile celulare ale replicării virale. Ele sunt un indicator util pentru demonstrarea naturii virale a unor leziuni celulare, iar morfologia şi dispoziţia lor caracteristică în anumite celule, constituie un important criteriu de diagnostic în unele viroze. Astfel, punerea în evidenţă a incluziunilor rabice (corpusculii Babes-Negri) în neuronii din cornul lui Ammon, permite precizarea diagnosticului de turbare la omul şi animalele suspectate de a fi murit în urma infecţiei cu acest virus.

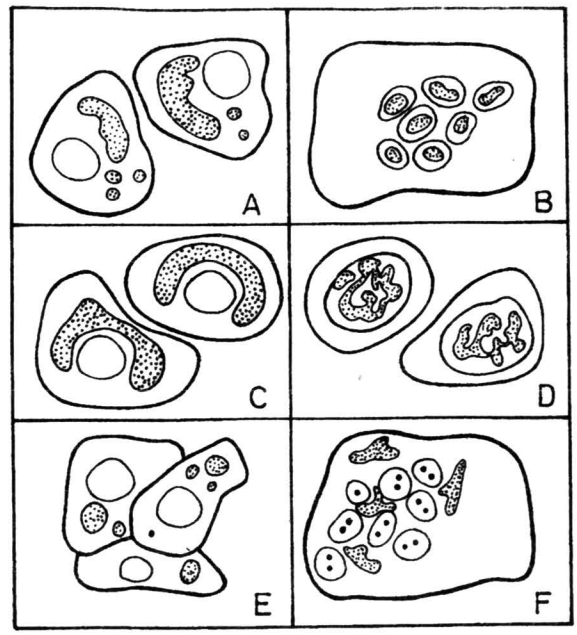


Fig. 170. Incluziunile virale. A. *Vaccinia:* incluziuni citoplasmatice acidofile (corpi Guarnieri); B. *Herpes simplex virus:* incliziuni tip B (corpussculi Cowdry); fuziunea celulară produce sinciţii. C. *Reovirus:* incluziuni citoplasmatice acidofile perinucleare. D. *Adenovirus:* incluziuni intracelulare bazofile. E. *Rabiesvirus:* incluziuni citoplasmatice acidofile (corpusculii Babeş-Negri). F. *Morbilivirus:* incluziuni intracelulare şi citoplasmatice acidofile; fuziunea celulară produce sinciţii (după Fenner, 1974).

5. *Scăderea rezistenţei membranelor lizosomale* are drept urmare, eliberarea enzimelor hidrolitice în citoplasmă şi prin aceasta, agravarea celorlalte mecanisme de producere a efectului citopatogen.

În celula animală, modificările lizosomale care determină efecte citopatice evoluează în două etape: a)creşterea permeabilităţii membranelor lizosomale (cu păstrarea conţinutului enzimatic); b)difuzia enzimelor lizosomale în citoplasmă şi absorbţia lor secundară în nucleul celulei infectate, asociată cu modificări morfologice (rotunjirea celulei) şi pierderea afinităţii pentru coloranţii vitali.

În concluzie, efectul citopatic este consecinţa modificărilor structurale, biochimice şi funcţionale ale celulei infectate cu un virus.

Efectul citopatic se exteriorizează prin următoarele modificări: a) constricţia celulelor, care devin mai mici, se rotunjesc, iar citoplasma devine granulară (caracteristice arbovirusurilor); b) mărirea celulelor, rotunjirea, creşterea refringenţei lor şi apariţia tendinţei de agregare (caracteristice adenovirusurilor); c) vacuolizarea citoplasmei (virusurile vacuolante tip SV_{40}), precum şi alterări nucleare sau citoplasmatice, cu diferite grade de intensitate.

Efectul citocid şi de distrugere litică a celulelor infectate cu virus se exteriorizează macroscopic, în culturi celulare în monostrat, prin apariţia discontinuităţilor pânzei celulare, denumite *plaje de liză*. Ele apar ca nişte zone clare în mijlocul unui strat confluent de celule învecinate, de obicei ca rezultat al multiplicării în cicluri succesive, a unei singure particule virale din inoculul iniţial. "Plaja de liză" este rezultatul distrugerii litice a celulelor infectate în cicluri succesive de multiplicare. Forma şi mărimea plajelor pot furniza date utile pentru identificarea virusului. Virusurile care nu lizează celula gazdă, nu produc plaje de liză.

Interacţiunea virus-celulă este modulată de particularităţile funcţionale, atât ale virusului, cât şi ale celulei. Interacţiunea citolitică produce inhibiţia sintezei macromoleculelor specifice celulei, denumită şi "efect de întrerupere". În absenţa sintezei compensatorii, care să înlocuiască moleculele uzate, apar modificări funcţionale şi structurale, incompatibile cu viaţa.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

TIPURI DE RELAŢII ÎNTRE VIRUSURI ŞI ORGANISME

Multiplicarea virusurilor în organism este influenţată de proprietăţile fiecărui virus, dar şi de câteva particularităţi ale gazdei:

- de numărul celulelor sensibile şi de posibilitatea de acces a virusului la substratul celular permisiv;
- de intensitatea şi complexitatea reacţiilor de apărare a gazdei, care determină eliminarea şi inactivarea virusului şi/sau a celulelor infectate.

Datorită potenţialului citolitic sau perturbării funcţiilor specifice ale celulelor infectate, virusurile au potenţial *patogen* asupra organismului infectat.

Patogenitatea este o proprietate generală a virusurilor şi este definită de mecanismele prin care un virus produce o maladie la organismul gazdă. Patogenitatea virală s-a studiat pe modelul experimental al animalelor de laborator, dar rezultatele nu sunt întru-totul extrapolabile şi analoge infecţiilor în condiţii naturale, la om şi animale.

Expresia cantitativă a patogenităţii este *virulenţa virală*. Virulenţa este o proprietate multifactorială, care exprimă capacitatea unui virus de a se multiplica şi de a se disemina în organism, în competiţie cu efectorii răspunsului imun şi de a produce stări patologice de diferite intensităţi. Virulenţa se exprimă totdeauna în raport cu un organism dat. Virusurile care au efect citolitic (citocid) au virulenţă extremă, în timp ce virusurile ale căror interacţiuni cu celula gazdă, se manifestă prin efect citochinetic (transformant), au o virulenţă moderată (sunt virusuri temperate).

Tropismul viral

Particularităţile de patogenitate a virusurilor, în special ale celor infecţioase pentru organismul uman şi animal sunt determinate de tropismul lor.

Tropismul sau afinitatea semnifică proprietatea unui virus de a infecta anumite specii de organisme (*genotropism*), anumite ţesuturi (*histotropism*) sau anumite celule ale unui ţesut (*citotropism*).

In condiţii experimentale, unele virusuri (vaccinal, rabic, etc.) pot infecta un număr mare de specii animale, cu condiţia utilizării unei doze suficient de mari de inocul. In condiţii naturale, spectrul de gazdă al unor virusuri este foarte limitat. De exemplu, virusurile gripale produc efecte patologice numai la om, virusul polio şi rinovirusurile infectează numai omul, iar aftovirusul infectează animalele paricopitate.

Maladiile virale se caracterizează prin specificitate de gazdă şi un set specific de simptome (sindrom). Simptomele infecţiei sunt adeseori corelate cu localizarea tisulară specifică a leziunilor (tropism celular). Poliovirusul infectează celulele nazofaringelui şi ale mucoasei intestinale umane. Forma paralitică a infecţiei cu poliovirus, este determinată de specificitatea sa strictă pentru celulele din coloanele anterioare ale măduvei spinării. O specificitate asemănătoare este proprie virusurilor *coxsackie,* care infectează celulele nazofarigiene, dar spre deosebire de poliovirus, au afinitate pentru muşchii scheletici şi cel cardiac.

Pătrunderea virusului în organism, are loc la nivelul mucoaselor (respiratorie, gastro-intestinală, genito-urinară) sau a leziunilor tegumentare. In raport cu tropismul lor pentru diferite celule, unele virusuri produc leziuni tisulare la nivelul porţii de intrare şi realizează astfel un focar infecţios primar. Din focarul primar, infecţia se extinde în teritoriile învecinate, în două modalităţi:

- trecerea directă a virionilor, din celula infectată, în cele adiacente. Infecţia progresează foarte rapid;
- eliberarea virionilor la exteriorul celulei şi reluarea ciclului de adsorbţie şi fixare pe celulele adiacente, caz în care sunt expuşi sistemelor de apărare a organismului.

Alte virusuri, de la locul pătrunderii şi eventual al multiplicării primare, trebuie să fie *diseminate*, pentru a ajunge la celulele sensibile, permisive pentru replicare. Diseminarea este mediată de *secreţii, limfă* sau *sânge*. O cale particulară de disemimnare este cea *axonală* (proprie virusului rabic).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Manifestările patologice ale infecţiilor virale sunt variabile şi dependente de histotropism şi citotropism. In raport cu aceste proprietăţi, virusurile pot fi clasificate în următoarele categorii:

- virusuri *dermotrope*, cu afinitate pentru tegument şi mucoase (poxvirusuri);
- virusuri *neurotrope*, cu tropism pentru SNC (virusul rabic,virusurile encefalitogene, virusul polio);
- virusuri *dermo-neurotrope*, cu afinitate pentru celulele tegumentare şi pentru SNC (virusurile herpetice);
- virusuri *organotrope* (viscerotrope), cu afinitate pentru organele interne (virusurile hepatitice);
- virusuri *pantrope*, cu afinitate pentru celulele sistemului reticuloendotelial.

Tropismul virusurilor pentru anumite ţesuturi se determină, în general, prin inocularea intravenoasă la un animal sensibil a suspensiei virale, urmată de cercetarea prezenţei virusului în fiecare ţesut sau organ.

Proprietatea definitorie a virusurilor, de a fi parazite absolute ale nivelului celular de organizare a materiei vii, implică afinitatea lor obligatorie pentru anumite categorii de celule (citotropism). Virusurile au afinitate, îndeosebi pentru celulele normale sau patologice care se divid cu o rată mai înaltă, dar şi pentru celule care nu se divid, înalt specializate ca structură şi funcţie. De exemplu, virusul polio infectează motoneuronii din măduvă, dar în cazurile grave, chiar neuronii din coloanele posterioare, ganglionii senzitivi de pe rădăcinile dorsale ale nervilor, neuronii substanţei reticulate, nucleii cerebeloşi, cortexul motor din girul precentral.

Mecanismele tropismului celular nu sunt pe deplin înţelese, dar cea mai plauzibilă ipoteză este că celulele poartă pe suprafaţa lor, molecule receptoare specifice, necesare interacţiunii iniţiale dintre virus şi celulă. Ipoteza a fost dedusă din modificarea sensibilităţii unor celule după cultivare. De exemplu, rinichiul uman şi amniosul, *in situ* nu sunt infectate de *Poliovirus*, dar devin foarte sensibile după cultivare. Sensibilitatea este corelată cu apariţia pe suprafaţa celulelor, a situsurilor de legare a virusului.

Tipuri de infecţii *in vivo*

Interrelaţiile dintre virusuri şi organisme sunt modulate de patogenitatea virală, de sistemele de apărare a organismului, de tipul celulelor infectate. Astfel modulată, multiplicarea virusurilor în organism produce mai multe tipuri de infecţii: *infecţia acută, infecţia inaparentă, infecţia persistentă*, cu diferitele sale modalităţi de evoluţie:

- infecţia cronică
- infecţia latentă
- infecţia lentă

Infecţiile *inaparente* definesc situaţiile în care, infecţia şi replicarea virală nu sunt însoţite de manifestări clinice. Virusul se multiplică într-o măsură limitată, în celulele pentru care manifestă un tropism natural şi nu determină un proces de îmbolnăvire. De exemplu, virusul polio manifestă un tropism evident pentru celulele mucosei digestive, dar infecţia evoluează inaparent. Leziunile poliomielitice, cu manifestări patologice apar la un număr redus de persoane, la care virusul infectează motoneuronii medulari.

Infecţiile inaparente au o importanţă deosebită în *epidemiologie*. Ele reprezintă rezervoare necunoscute de virus, foarte greu de depistat. Evoluţia unei infecţii, în forma sa inaparentă este condiţionată, în principal, de sistemele specifice de apărare a gazdei (sistemul imunitar celular şi humoral) şi de sistemele nespecifice de apărare (interferonii).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Infecţiile acute sunt determinate de virusurile care depăşesc sistemele de apărare a organismului şi produc leziuni mai mult sau mai puţin ample. Este alterată starea generală a organismului.

Pentru infecţiile acute, perioada de incubare este urmată de perioada "de stare", cu manifestările clinice. La nivel celular, infecţiile acute sunt de tip *productiv*. Este produs virus progen şi de cele mai multe ori se produce liza celulară. Aceste infecţii au o durată limitată în timp. Rezultatul final al infecţiei, depinde de virulenţa agentului infecţios şi de intensitatea reacţiilor de apărare a gazdei. De cele mai multe ori, virusul este eliminat din organism, lăsând după caz, o stare de imunitate mai mult sau mai puţin solidă.

Infecţiile persistente au o durată foarte îndelungată de evoluţie, uneori pentru tot restul vieţii. Ele pot avea acest tip de evoluţie de la început, adică din momentul infecţiei, dar uneori, persistenţa este consecutivă unei infecţii acute.

Persistenţa virală

Infecţiile *persistente* sau *de durată* constituie un fenomen biologic semnificativ pentru interacţiunea unor virusuri cu gazdele lor.

Dispariţia simptomelor unei infecţii acute nu este totdeauna însoţită de eliminarea virusului. Uneori, virusul se păstrează în organism într-o formă oarecare, ceea ce determină *recurenţa* (revenirea) formei acute a infecţiei şi bolii sau a formei atenuate a acesteia.

Aspectele moleculare care condiţionează evoluţia persistentă a infecţiei nu se cunosc. Ele au fost studiate *in vitro*, în sisteme celulare. Rezultatele nu pot fi întru-totul extrapolate pentru a explica persistenţa celulară *in vivo*, deoarece infecţia naturală este produsă de o tulpină sălbatică de virus, care poate interacţiona cu o multitudine de tipuri celulare specializate, dar mai ales pentru faptul ca *in vivo*, virusul se multiplică sub presiunea selectivă permanentă a factorilor de apărare a gazdei.

Infecţiile persistente au fost împărţite în trei categorii:

- *infecţii persistente*, în cursul cărora virusul este produs permanent. Au fost denumite infecţii *cronice* sau *productive*. Cele mai cunoscute sunt infecţiile produse de virusul hepatitei B umane şi de virusul coriomeningitei limfocitare (LCM) la şoarece;

- *infecţia latentă* se caracterizează prin perioada îndelungată a evoluţiei, în cursul căreia virusul nu este produs permanent, ci numai la intervale de timp;

- *infecţii lente*, denumite impropriu, infecţii cu virusuri lente. Ele formează un grup având caracteristici definitorii, perioada de incubare foarte lungă, evoluţia progresivă şi lentă a procesului patologic, datorită persistenţei virusului, dar fără a omorî celulele infectate şi fără apariţia semnelor vizibile de infecţie. La om şi animale, infecţiile lente pot determina şi declanşa boli degenerative cronice. O infecţie lentă tipică este produsă de virusul Visna (un retravirus), agentul panencefalitei bovinelor.

Această clasificare este încălcată de numeroase excepţii, deoarece pentru unele virusuri, persistenţa implică succesiunea etapelor de infecţie productivă şi latentă. De exemplu, virusul hepatitei B (VHB) infectează cronic (productiv) hepatocitele, dar limfocitele sunt infectate latent, iar virusul Epstein-Barr (EBV) infectează productiv celulele epiteliului faringian, dar infectează latent limfocitele B.

Pentru ca un virus să producă o infecţie persistentă, trebuie să îndeplinească trei condiţii:

- să nu lizeze celula infectată (efectul citopatic să fie minim);
- genomul viral să poată fi menţinut pe termen lung în celula gazdă;
- să evite detectarea şi eliminarea de către efectorii sistemului imunitar.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Infecţiile persistente în organismul uman sunt produse de următoarele virusuri:

Virusul	Locul persistenţei	Consecinte
Adenovirusuri	Adenoide, tonsile, limfocite	Necunoscute
CMV	Rinichi, glande salivare, limfocite ?, macrofage ?, celule stromale ale maduvei osoase	Pneumonie, retinită
EBV	Celule epiteliale faringiene, limfocite B	Mononucleoza infecţioasă, limfomul Burkitt, carcinom nazofaringian, limfom non-Hodgkin
HSV I şi 2	Neuronii ganglionilor senzitivi	Leziuni herpetice orale, genitale, encefalita, keratita
Virusul herpetic uman 6	Limfocite	Exantem
VZV	Neuronii ganglionilor senzitivi şi celulele satelite	Varicela zoster
VHB	Hepatocite, limfocite ?, macrofage ?	Hepatita, carcinom hepato-celular
VHD	Hepatocite	Exacerbarea infecţiei cronice cu HBV
Papiloma virus	În celulele epiteliale tegumentare	Papiloma, carcinoma
Parvovirus B_{19}	Celulele precursoare ale eritrocitelor din maduva osoasă	Anemie hemolitică aplazică, deficienţa cronică a măduvei osoase
Polioma virus BK	Rinichi	Cistita hemoragică
Polioma virus JC	Rinichi, oligodendrocite în SNC	Leucoencefalopatie multifocală
VHC	Hepatocite, limfocite ? macrofage ?	Hepatita, carcinom hepatocelular
Virusul rujeolei	Neuroni şi celule gliale ? în SNC	Panencefalita sclerozantă subacută
Rubela virus	SNC	Panencefalita progresivă, diabet-insulino-dependent ? artrita juvenilă ?
HIV	Limfocite T_{CD4}, monocite, macrofage, microglie,	SIDA
HTLV I	Limfocite T	Leucemia celulelor T, polimiozită
HTLV 2	Limfocite T	Necunoscută

După R. Ahmed, 1996

Virusurile care produc infecţii echlibrate cronice, adică infectează productiv dar nu lizează celula, evoluează ca infecţii persistente. Ele nu perturbă echilibrul funcţional al celulei şi persistă ca infecţii cronice de lungă durată (de exemplu, virusul corio-meningitei limfocitare la şoarece (LCMV) şi virusul hepatitei B (VHB).

Infecţiile persistente sunt produse şi de virusurile cu potenţial litic, când infectează celule nepermisive, sau atunci când se selectează în timp, variante virale mai puţin virulente. Un virus dat poate fi litic pentru unele celule, dar nu pentru altele. De exemplu, HIV lizează limfocitele T, dar este mai puţin virulent şi litic pentru celulele seriei monocit-macrofag.

Mecanismele persistenţei virale

Persistenţa virală presupune, ca o condiţie obligatorie, păstrarea virusului sau cel puţin a genomului viral în celula infectată.

Persistenţa genomului. Dacă celula infectată se divide, genomul viral trebuie să se replice pentru a nu se dilua în celulele fiice. La retravirusuri, genomul viral se replică odată cu replicarea ADN al celulei gazdă. Genomul parvovirusurilor, ca şi al retravirusurilor este integrat într-un cromosom al celulei.

În neuroni (celule care nu se divid), genomul herpesvirusurilor se menţine fără să se replice, sub forma unei molecule circulare fizic independente.

Infecţiile latente sunt produse mai frecvent de virusurile cu genom ADN, probabil pentru că celula păstrează mai uşor ADN, fie integrat, fie ca moleculă fizic–independentă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virusurile ARN pot produce infecții cronice în cazul în care virusul se replică continuu cu o rată scăzută sau când genomul viral se integrează în cromosomii celulei și este replicat sincron cu ADN celular.

Evitarea efectorilor sistemului imunitar. Aproape toate virusurile care infectează persistent, exprimă într-o măsură limitată informația lor genetică. Genele HSV în neuroni nu sunt exprimate, cu excepția unei regiuni a genomului. In neuronii infectați, proteinele virale sunt practic absente și neuronii nu expun la suprafață, proteine virale și nu sunt detectați de efectorii sistemului imunitar. Dar starea de latență este defavorabilă propagării virusului. Latența este întreruptă de infecția productivă în celulele epiteliale permisive.

Uneori, virusurile persistente infectează țesuturi cu statut imunitar privilegiat. SNC este un astfel de țesut, deoarece bariera sânge-creier limitează traficul limfocitar, iar neuroniii nu exprimă moleculele CMH I și II și după o posibilă infecție nu pot fi detectați de limfocite.

Papilomavirusurile BK și JC persistă în rinichi, cu producere și eliberare de virus progen pentru perioade lungi. Limfocitele au un acces limitat la celulele epiteliale infectate pentru că sunt protejate de membrana bazală și de endoteliul vascular. Afirmația este valabilă și pentru celulele epiteliale ale glandelor exocrine sau endocrine. De altfel, EBV și CMV persistă în glandele salivare.

Țesutul epitelial al epidermei, este deasemenea un situs privilegiat imunitar, în care persistă papilomavirusurile.

Virusurile, în special cele cu genom ARN, suferă evenimente mutaționale cu o frecvență mare, iar în condițiile presiunii selective de apărare specifică, variantele antigenice apar cu rapiditate. Exemplul clasic este oferit de variantelc cc apar prin mecanismele de shift și drift genetic ale celor două glicoproteine de înveliș (HA și NA). Virusul influenzà nu produce o infecție persistentă în organismul uman, dar apariția sezonieră a variantelor realizează persistența în populația umană.

Variația antigenică se produce și la virusurile care infectează persistent, în special la lentivirusuri (de exemplu, virusul anemiei infecțioase equine, virusul Visna al ovinelor, virusul artritei/encefalitei caprinelor, HIV, SIV). Serul de cal infectat neutralizează izolatele virale din episoadele clinice anterioare.

Virusurile care produc infecții persistente la om (HIV, EBV, VHB) generează variante antigenice noi, care scapă mecanismelor recunoașterii de către limfocitele Tc, iar proteinele E_3 și E_{1a} ale adenovirusului tip 2 se complexează în citoplasmă cu moleculele CMH, astfel încât complexul format diminuă exprimarea moleculelor CMH pe suprafața celulei.

Un alt mecanism al persistenței virale este toleranța imunitară. Exemplul clasic este al virusului corio-meningitei limfocitare (LCMV), care la șoarecii infectați *in utero* elimină selectiv clonele de limfocite reactive și produce o infecție persistentă cu viremie, pentru tot restul vieții. Persistența este însoțită de absența limfocitelor Tc reactive față de antigenele virale. Transferul limfocitelor Tc specifice la animalele purtătoare cronic, elimină virusul și sterilizează gazda.

Infecții persistente la om

Cea mai cunoscută infecție virală persistentă productivă (cronică), datorită gravității ei, este produsă de HBV. Infecția se face prin transfuzia sângelui contaminat, prin folosirea acelor și seringilor contaminate, dar și transplacentar, perinatal (în timpul expulziei fetale) și chiar prin lichidul spermatic. După infecție, virusul se multiplică în hepatocite și produce *hepatita acută*. După vindecarea clinică, organismul nu se sterilizează. Intre 2 și 10% dintre adulți și 80-90 dintre copiii infectați acut devin purtători cronici. Pentru o anumită perioadă de timp, hepatocitele continuă sa producă virus. Hepatita devine cronică și este însoțită de viremie. Sursa principală de virus este hepatocitul, dar în unele cazuri, celulele pancreatice și celulele stromale ale măduvei osoase produc și elimină virus progen. Intr-un interval de timp de ordinul anilor, unii indivizi se sterilizează, iar alții rămân infectați cronic. La cei care se sterilizează de virus, în ser se găsesc la titru crescut, anticorpii anti-HBs, anti-pre S_1 și anti-pre S_2. La purtătorii cronici, anticorpii anti-HBs nu sunt detectabili, dar au anticorpi anti-HBc și anti-Hbe.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Infecţiile latente cu herpesvirusuri se caracterizează prin aceea ca genomul viral persistă în celulele infectate, dar virusul progen nu se maturează, cu excepţia unor episoade intermitente.

Infecţia cu HSV-1 are loc între 6 luni şi 5 ani de la naştere. După infecţia primară, virusul se multiplică în mucoasa cavităţii orale şi produce o stomatită acută, febrilă, cu adenopatie locală şi determină o leziune caracteristică la nivelul joncţiunii dintre tegument şi mucoasa labială.

Infecţia cu HSV-2 se produce, probabil, la începutul vieţii sexuale. Replicarea primară are loc în celulele mucoasei genitale. De la nivelul mocoaselor, unde se desfăşoară un prim ciclu de replicare, virusurile herpetice, probabil sub forma nucleocapsidelor sunt transportate la ganglionii senzitivi regionali: ganglionul Gasser şi respectiv ganglionii sacrali. Nucleocapsidele sunt translocate prin transport axonal retrograd, la corpul neuronilor, unde suferă una din cele două modalităţi de infecţie;

- *o infecţie productivă*, cu eliberarea virusului progen şi posibila diseminare în ţesutul nervos, consecinţa fiind encefalita;

- *o infecţie latentă*, cu transcriere genică limitată, fără producerea virusului matur.

In infecţia latentă, ADN viral se găseşte în stare fizic independentă, sub forma circulară, deosebită de configuraţia lineară în virion.

Neuronii ganglionari conţin copii ale ADN viral, detectabile prin metoda hibridării Southern şi prin metoda amplificării secvenţelor ADN viral (PCR). Nu s-au detectat proteine virale. Sunt transcrise numai copiile LATs (*L*atency *A*ssociated *T*ranscripts).

Latenţa herpetică este consecinţa stopării ciclului de replicare, prin absenţa transcrierii timpurii imediate. După unii autori, latenţa virusurilor herpetice este posibilă numai în neuroni, deoarece nu sunt oferite condiţiile optime ale replicării sale.

Activarea virusului latent *in vivo*, se produce sub acţiunea mai multor factori: imunosupresia, schimbări hormonale, stress, expunerea la raze UV, traumatisme. Stimulii produc modificări ale fiziologiei neuronale, favorizând transcrierea genelor virale. Nucleocapsidele virale sunt transportate centrifug prin prelungirile nervoase până la joncţiunile neuro-epidermice. Virusul străbate joncţiunea neuro-epidermică şi infectează celulele epiteliale. Se iniţiază ciclul litic de replicare virală. Repetarea ciclului litic în celulele învecinate produce leziunea herpetică recidivantă.

Genomul său persistă sub forma unei molecule circulare închisă şi trebuie să se replice, pentru a nu se dilua în neuroni. Se produce o alternanţă a infecţiei latente cu cea de tip productiv, datorită alternanţei stărilor fiziologice ale celulei.

Probabilitatea recurenţelor produse de HSV-1 şi HSV-2 scade cu vârsta.

Infecţia cu virusul Epstein-Barr (VEB) se face prin saliva care conţine virus infecţios. Urmează o multiplicare în celulele epiteliale ale orofaringelui, care poate sa continue la unii indivizi, ca o infecţie cronică. Virusul infectează limfocitele B într-un mod necunoscut şi rezultă o infecţie latentă neproductivă. In limfocitul B, ADN viral persistă sub forma moleculei circulare închise. Genomul viral trebuie să se replice, pentru a nu se dilua în populaţia limfocitelor B, care se divid. In celula infectată latent se sintetizează circa 11 proteine de latenţă, cu rol în replicarea genomului. Cele mai cunoscute sunt *EBNA* (*E*pstein-*B*arr *N*uclear *A*ntigen) 1 şi 2, evidenţiate prin metoda imunofluorescenţei în limfocitele B infectate persistent. EBNA 1 se leagă de secvenţa iniţiatoare a replicării genomului viral, în faza S a ciclului celular, iar EBNA 2 stimulează creşterea şi proliferarea limfocitelor B infectate, care sintetizează anticorpi policlonali.

O mică proporţie a limfocitelor B infectate latent, devin permisive pentru replicarea virală. Virionii progeni reinfectează celulele epiteliale ale orofaringelui şi astfel virusul se propagă în populaţia umană. In infecţia de tip cronic a epiteliului nazofaringian, virusul este protejat de sistemul imunitar, datorită inaccesibilităţii limfocitelor T.

Virusul varicella zoster (VZV) infectează celulele epiteliale ale mucoasei tractului respirator, orofaringelui sau conjunctivei. După replicarea primară, virusul este diseminat în celulele sistemului fagocitar mononuclear (SFM). Multiplicarea în aceste celule, produce viremie secundară.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După infecţia celulelor endoteliale ale capilarelor, virusul este răspândit în celulele epidermice şi produce leziuni cutanate caracteristice. Din celulele epiteliale, virusul infectează terminaţiile nervoase senzitive şi este transportat la ganglionii senzitivi, unde produce infecţia latentă. Reactivarea este indusă de imunosupresie, traumatisme etc. In ganglioni are loc multiplicarea, iar de aici virusul se diseminează prin transport axonal, într-un dermatom specific, infectează celulele epiteliale şi se multiplică productiv, cu leziunile specifice. Probabilitatea recurenţelor VZV creşte cu vârsta.

Papilomavirusurile umane sunt agenţii cauzatori ai negilor. Virusurile infectează neproductiv celulele stratului bazal al epidermei. Celulele epidermice devin permisive după ce se diferenţiază în keratinocite, în stratul spinos şi granular. Aceste virusuri nu se multiplică în sistemele celulare *in vitro*, cu excepţia celor foarte specializate.

Infecţia celulelor stratului bazal este favorizată de traumatismele epiteliale. Fiind nepermisive, în celulele stratului sunt transcrise genele programului timpuriu. Genomul viral este păstrat într-un număr mic de copii. Proteinele codificate de genele timpurii stimulează diviziunea celulelor în stratul bazal şi se formează un neg. Tesutul negului este format din straturi multiple de celule epiteliale, iar membrana bazală este intactă. Cheratinocitele devin permisive replicării şi se asamblează virus progen. Infecţia latentă propriu-zisă este limitată la celulele stratului bazal, care conţin genomul, dar lipsesc proteinele virale. Celulele sunt nepermisive pentru că genomul viral nu se poate replica. In absenţa proteinelor virale, rata diviziunii celulare rămâne în limite fiziologice şi negul nu apare. Negul poate sa apară tardiv, prin imunosupresie sau sub acţiunea altor stimuli. Celulele stratului bazal pot să poarte mult timp genomul viral, înainte de apariţia negului.

Adenovirusurile infecţioase pentru om aparţin la aproape 50 de serotipuri. Ele pătrund pe cale respiratorie, gastro-intestinală sau conjunctivală. Infecţiile acute sunt limitate la celulele epiteliale ale tractului respirator şi gastro-intestinal şi de obicei, sunt limitate.

Adenovirusurile pot să persiste în organism, producând o infecţie latentă în celule neepiteliale. Ele au fost descoperite în ţesutul adenoid infectat persistent, care nu a produs virus progen detectabil, înainte de cultivarea sa împreună cu celule sensibile.

Latenţa adenovirusurilor s-a evidenţiat în tonsile şi chiar în limfocitele circulante de la adulţii sănătoşi. Nu se cunoaşte mecanismul latenţei. ADN ar putea fi integrat în cromosomii celulei gazdă sau rămâne fizic independent.

Adenovirusurile persistente realizează o infecţie cronică, cu producere limitată de virus progen şi diseminare limitată la celulele sensibile învecinate. Produsul transcrierii regiunii genomice E_3 inhibă citoliza mediată de TNF şi blochează recunoaşterea de către limfocitele Tc, prin legarea moleculei E_3 de 19 kD, de moleculele CMH I.

Virusurile asociate adenovirusurilor (AAV) din g. *Dependovirus* pot să persiste în stare latentă *in vivo* (la om) şi *in vitro*. ADN viral este *integrat* în cromosomii perechii 19. Genomul lor este ADN monocatenar linear. Multiplicarea este dependentă de suprainfecţia celulei cu un adeno- sau cu un herpesvirus. Se presupune ca infecţia latentă *in vivo* este comună la om, dar nu este asociată cu manifestări cunoscute.

După infecţie, genomul AAV este exprimat într-o măsură limitată şi se replică. Integrarea se face sub forma copiilor dublu-catenare repetate în tandem. In celula suprainfectată cu un virus helper, genomul AAV este excizat din inserţiile sale şi se asamblează virus progen infecţios.

Virusul rujeolic produce, de obicei, o infecţie acută şi autolimitată. Virusul infectează acut epiteliul tractului respirator, oro- şi nazofaringian sau conjunctiva. După replicarea primară, virusul ajunge în ganglionii limfatici, unde se desfăşoară ciclul de replicare secundară. De aici, virusul, după ce a infectat leucocitele, trece în sânge. In cursul viremiei secundare, virusul este diseminat în celulele endoteliului vascular şi rezultă o infecţie generalizată acută. De cele mai multe ori, după infecţia acută, virusul este eliminat complet din organism, iar memoria imunitară se păstrează tot restul vieţii. In faza viremiei secundare, probabil virusul pătrunde în SNC, prin infecţia capilarelor meningeale, a membranei piamater sau a plexurilor coroide. Cu o frecvenţă mare, virusul rujeolic determină *infecţii persistente ale neuronilor* şi produce encefalita post-infectioasă acută şi rareori, *panencefalita sclerozantă subacută (PESS)*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În neuronii infectaţi, s-au detectat nucleocapside, iar titrul anticorpilor în lichidul cefalorahidian este crescut. Infecţia persistentă este neproductivă. Neuronul este o celulă nepermisivă pentru replicarea virusului rujeolic. Nu se sintetizează proteina M.

Celulele infectate evită acţiunea celulelor citotoxice prin fenomenul modulaţiei antigenice, ce constă în diminuarea cantitativă a anticorpilor specifici. Fenomenul a fost evidenţiat *in vitro*, prin adăugarea anticorpilor specifici faţă de virusul rujeolic, marcaţi cu fluorocromi, în mediul de creştere a celulelor infectate (neuroni şi limfocite). Se produce redistribuirea şi bonetarea glicoproteinelor virale expuse pe suprafaţa celulelor, urmată de eliminarea lor sub forma complexelor cu anticorpii. Celula modulează cantitatea antigenelor expuse la suprafaţă, diminuând cantitatea lor şi devine rezistentă la acţiunea efectorilor imunitari.

Modularea antigenică indusă de anticorpi are o semnificaţie biologică mai largă, în sensul că reprezintă un mecanism prin care celulele purtătoare de antigene (virale sau tumorale) pot să-şi reducă semnificativ cantitatea de molecule nonself exprimate pe suprafaţă, evitând astfel acţiunea mecanismelor de supraveghere imunitară.

Persistenţa HIV are particularităţi distincte. Iniţial, virusul se multiplică în celulele Langerhans la locul de intrare şi în celulele fagocitare. De aici se diseminează în ganglionii limfatici locali, apoi trece în sânge şi se diseminează sistemic. Aceasta este etapa *viremiei primare* în faza acută a infecţiei şi poate fi însoţită de manifestări clinice acute. Faza viremiei acute durează 2-4 săptămîni. Viremia primară scade rapid, datorită răspunsului imun mediat celular

Genomul viral se integrează stabil în ADN celular, ca provirus, în limfocitele T_{CD4} şi în celulele seriei monocit-macrofag. Ambele categorii de celule exprimă moleculele CMH II.

Infecţia cu HIV este *cronică şi productivă* ori *latentă*, în funcţie nu numai de tipul de celulă, ci şi de stadiul ei fiziologic. Celulele seriei monocit-macrofag sunt semipermisive pentru replicarea HIV, iar limfocitele T_{CD4} sunt permisive.

Rezultatul interacţiunii HIV-limfocit T_{CD4} depinde atât de tulpina de virus, cât şi de starea fiziologică a limfocitului. Dacă celula T_{CD4} este incapabilă să transcrie ARNm viral din provirusul integrat, HIV poate realiza o *infecţie latentă*. Dacă celula transcrie ARNm din provirus rezultă o *infecţie productivă*, cu eliberarea virusului progen şi diseminarea la alte celule sensibile

Limfocitele T_{CD4} de memorie sau cele care se activează după infecţia virală transcriu ARNm viral din genomul integrat. Activarea limfocitelor pare a fi mecanismul esenţial care controlează conversia de la infecţia latentă la cea cronică productivă.

Infecţia cronică productivă este condiţionată de incapacitatea efectorilor răspunsului imun de a elimină virusul.

Răspunsul imun primar, după contactul cu antigenele HIV este foarte energic. Se sintetizează anticorpi specifici, iar numărul limfocitelor T_{CD8} creşte de 10-20 de ori faţă de valorile normale. Limfocitele Tc diminuă viremia prin efect citotoxic direct asupra celulelor infectate, cât şi prin efect represor asupra replicării virale, mediat de citokine.

Anticorpii răspunsului imun primar, în esenţă, nu au efect protector. Anticorpii neutralizanţi se sintetizează în cursul răspunsului imun secundar, dar pe măsură ce infecţia progresează, ei sunt înlocuiţi cu anticorpii stimulatori (enhancing) ai infecţiei. Efectul stimulator este mediat de receptorii pentru Fc sau pentru complement (C_3), pe care virusul îi împrumută pentru a iniţia procesul infecţios.

Factorul major al persistenţei infecţiei este variaţia antigenică a virusului imunodeficienţei. La fiecare ciclu de replicare, revers-transcriptaza introduce o mutaţie punctiformă, la fiecare circa 2000 de baze încorporate. Mutaţiile determină sinteza unor noi variante antigenice, ceea ce face ca răspunsul imun să fie ineficient. Din punct de vedere biochimic, preparatul de virus formează un spectru continuu de virioni, strâns înrudiţi, dar diferiţi în proporţie de până la 7-8% din componentele lor.

Persistenţa infecţiei este favorizată şi de faptul ca virusul se poate disemina prin contact intercelular, astfel încât este inaccesibil anticorpilor.

Pe de altă parte, virionii se pot matura prin înmugurire, nu numai la suprafaţa celulei, ci şi în cisternele reticulului endoplasmic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

In concluzie, infecţiile persistente cronice creează o stare de purtător, însoţită de eliminarea continuă a virusului, o premisă a transmiterii la gazde noi. Chiar virusurile care în mod obişnuit lizează celulele gazdă permisive pot realiza infecţii persistente în anumite tipuri de celule. Dezoxiribovirusurile infectează uneori latent celulele nepermisive, datorită restricţiilor de replicare pe care le impune celula gazdă. In interacţiunea virus-celulă de tip echilibrat, persistentă, virusul pare a fi pasiv, spre deosebire de infecţia lizogenă fag-bacterie, modulată de represorul codificat de fag.

Virusurile cu genom ARN produc infecţii persistente numai după revers-transcrierea lor într-o copie de ADN.

Infecţiile persistente sunt foarte răspândite în natură. Sunt frecvente la animalele de laborator şi prezintă o importanţă practică deosebită, deoarece, după inocularea experimentală cu microorganisme patogene sau cu virusuri, există posibilitatea activării infecţiei latente. Infecţia virală latentă activată poate să modifice particularităţile de patogenitate a agentului inoculat experimental şi chiar să domine tabloul simptomatologic.

Infecţiile persistente sunt răspândite la artropode (căpuşe, insecte). Ele reprezintă mari rezervoare de virus în natură, deoarece sunt gazde în care se multiplică virusurile patogene pentru om şi animale.

Numeroase plante de cultură sau din flora spontană sunt infectate persistent de virusuri cu spectru de gazdă foarte larg, care infectează alternativ, organismul vegetal şi animal. Ele creează rezervoare necunoscute de virusuri, din care este posibilă evoluţia unor virusuri de mare importanţă clinică pentru om şi animale.

Interferonii şi mecanismele acţiunii lor

Interferonii sunt o categorie de substanţe a căror sinteză este indusă de diferiţi agenţi chimici sau biologici. Funcţiile lor se caracterizează printr-un spectru larg de activităţi nespecifice, cea mai importantă fiind *inducţia stării antivirale.*

Interferonul a fost descoperit de Isaacs şi Lindenmann (1957). Ei au observat că injectarea membranei corioalantoice a ambrionului de găină, cu virus influenza inactivat (denumit virus *inductor* sau interferent), blochează replicarea ulterioară a virusului influenza infecţios (virus *revelator* al interferenţei). Autorii au arătat că inhibiţia replicării virale (interferenţa), se datorează unui factor inhibitor, pe care l-au denumit *interferon (IFN).*

Elucidarea naturii chimice şi a modului de acţiune a interferonilor a constituit o problemă de interes major a biologiei moleculare şi a virologiei în ultimele decenii.

Inducerea stării antivirale este cea mai importantă funcţie a interferonilor, dar ei au şi alte activităţi biologice majore:

- inhibiţia multiplicării celulelor normale şi tumorale
- reglarea proceselor de diferenţiere celulară
- reglarea funcţiei imunitare.

Natura interferonilor. Diferitele variante moleculare de interferoni au fost grupate în trei clase: IFN-alfa, IFN-beta şi IFN gama. Interferonul alfa este produs de leucocite, iar interferonul beta este sintetizat de fibroblaste. Ambele clase aparţin interferonilor de tip I. Interferonul gama este produs de limfocitele activate sub acţiunea antigenului specific sau a substanţelor mitogene şi reprezintă interferonul de tip II. Deoarece, *in vivo,* este sintetizat de limfocitele T activate, de limfoblastele seriei B şi de limfocitele granulare mari, interferonul gama este considerat a fi *de tip imun.* IFN de tip I sunt inductori ai rezistenţei antivirale, iar IFN II este un modulator mai bun al reactivităţii sistemului imunitar.

Distribuţia interferonilor în cele trei clase se bazează pe proprietăţile lor antigenice individuale. Antiserul specific faţă de moleculele de interferon ale unei clase nu precipită şi nu neutralizează acţiunea interferonilor celorlalte două clase.

In general, moleculele de interferoni sunt glicoproteine. Interferonii beta şi gama au resturi glucidice legate la asparagina 80 şi respectiv 25 şi 97. Majoritatea interferonilor alfa nu sunt glicozilaţi. Glicozilarea nu este esenţială pentru exprimarea activităţilor biologice, ceea ce explică faptul că interferonii sintetizaţi în celulele bacteriene, de genele codificatoare clonate au activitate biologică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Interferonii alfa şi beta sunt stabili chiar la pH 2 şi îşi păstrează activitatea în prezenţa SDS, ultima fiind o proprietate foarte importantă pentru purificare.

Sinteza interferonilor. In mod obişnuit, celulele normale nu sintetizează cantităţi detectabile de interferoni. Genele codificatoare ale sintezei lor nu sunt transcrise. Sinteza interferonilor este indusă de diferiţi agenţi: virusuri infecţioase sau inactivate, moleculele de ARN dublu catenare helicale, endotoxinele bacteriilor Gram negative (*Brucella* sp., *Listeria monocytogenes*), infecţia cu micoplasme, cu rickettsii şi chlamidii, polimerii sintetici, mananii (polizaharide), diferiţi activatori metabolici etc.

Pentru virusurile cu genom ARN dublu catenar, inductorul sintezei de interferon este chiar genomul viral. Virusurile cu genom ADN, cu excepţia celor din grupul pox sunt slab inductoare, iar cele cu genom ARN monocatenar sunt inductoare ale sintezei interferonilor, deoarece ARN se replică printr-un intermediar dublu catenar.

ARN monocatenar, ADN mono- sau dublu catenar, ca şi hibrizii ADN-ARN nu sunt inductori ai sintezei interferonilor.

Virusurile inactivate (din vaccinuri), ca şi cele ce infectează un substrat nepermisiv sunt inductoare ale sintezei interferonilor.

In vitro, la 37°, sinteza începe la 4 ore după infecţia virală şi atinge rata maximă concomitent cu sinteza proteinelor virale.

Informaţia genetică codificatoare a sintezei interferonilor este distribuită în trei familii de gene. Sinteza interferonului alfa este codificată de 14 gene şi 7 pseudogene, localizate pe braţul scurt al cromosomilor perechii a 9-a. Interferonul beta este codificat de o genă (sau câteva), cu aceiaşi localizare, iar interferonul gama este codificat de o singură genă localizată pe perechea a 12-a de cromosomi. Ca o caracteristică, nici una din gene nu conţine introni.

Cel mai bun inductor al sintezei de interferon este ARN dublu catenar natural sau sintetic. Mecanismul inducţiei nu este cunoscut. Probabil, ARN dublu catenar induce sinteza unui factor, care, la rândul său neutralizează represorul specific al transcrierii acestor gene. Factorul determinant al inducţiei este însăşi natura bicatenară a moleculei de ARN şi nu informaţia genetică înscrisă în ea. Nu se cunoaşte nici mecanismul inducţiei sintezei interferonului gama (de tip imun), în limfocitele activate de antigenul specific sau stimulate de mitogene.

Inducţia sintezei interferonilor necesită sinteza ARNm şi traducerea sa în catena polipeptidică. Inhibitorii sintezei proteinelor (actinomocina D), administraţi simultan cu inductorul, inhibă sinteza interferonilor.

Interferonii secretaţi de diferite specii de organisme sau de diferite categorii de celule ale unui organism, prezintă deosebiri legate de secvenţa aminoacizilor, de conţinutul glucidic, care au stat la baza grupării lor în cele trei clase.

Toţi interferonii se sintetizează ca precursori de 166 aminoacizi, cu secvenţe semnal N-terminale de 20-23 aminoacizi, necesare secreţiei. Dimensiunle reale ale catenei polipeptidice sunt de 143, 145 şi respectiv de 146 resturi de aminoacizi.

Molecula de interferon are două domenii cu secvenţe de aminoacizi relativ constante: unul în jumătatea N-terminală, care formează situsul de legare pe receptorul celular, iar celalalt, în jumătatea C-terminală, pare să moduleze legarea de receptor şi probabil mediază funcţiile biologice.

Studiul biochimic al moleculei de interferon a fost înlesnit de obţinerea anticorpilor monoclonali specifici faţă de diferite tipuri de interferon.

Interferonii se sintetizează, probabil, la toate clasele de vertebrate.

Activităţi biologice efectoare ale interferonilor

Activitatea biologică principală a interferonilor este cea antivirală şi a fost demonstrată experimental. Infecţiile virale sunt mult mai severe la animalele de experienţă, cărora, odată cu virusul infecţios li s-au injectat anticorpi specifici anti-interferon.

Interferonii formează prima linie de apărare umorală faţă de infecţiile virale, înainte de mobilizarea răspunsului imun. Interferonii protejează celulele de efectele citopatice virale, dar nu elimină complet infecţia. Starea de protecţie antivirală, indusă de interferoni durează câteva zile şi apoi dispare. După câteva zile de absenţă, starea de protecţie poate fi indusă din nou.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Interferonii nu au acţiune antivirală directă, ci *induc o stare antivirală.*

Interferonii au specificitate de specie, adică activităţile biologice şi în special efectul protector antiviral se manifestă faţă de orice virus, în raport cu celulele speciei care a produs interferonul. Baza specificităţii de acţiune, rezidă în interacţiunea dintre interferon şi receptorul celular. Activitatea biologică a interferonilor este direct proporţională cu afinitatea lor de legare cu substratul celular. Interferonul de şoarece are, *in vitro*, efect protector faţă de celulele de şoarece, indiferent de virusul infectant. Acelaşi interferon are un efect protector minim (5%) faţă de celulele de şobolan, iar pentru celulele umane, efectul protector este nul.

Protecţia antivirală este dependentă de concentraţia interferonilor. Dozele mari, administrate în sisteme experimentale, *in vitro*, sunt protectoare faţă de nivelul scăzut al multiplicităţii de infecţie, asemănător celui natural. Multiplicitatea înaltă de infecţie (cea experimentală), depăşeşte efectul protector al interferonilor.

Descoperirea interferonilor a condus la revizuirea conceptului imunităţii celulare şi a rolului său în limitarea infecţiilor virale. Sistemul interferonului este primul care îşi exercită efectul protector, dintre toate sistemele de apărare cunoscute. El este operativ în decurs de câteva ore de la infecţie.

Cele mai multe virusuri sunt inductoare ale sintezei interferonului şi sunt sensibile, în diferite grade, la acţiunea lui.

Interferonul este produs de celulele infectate, concomitent cu desfăşurarea ciclului multiplicării virale. Este eliberat din celule imediat după sinteză şi difuzează spre celulele înconjurătoare, la care induce starea antivirală. Astfel, virusul, în ciclul său replicativ, întâlneşte o barieră intracelulară. Nivelul activităţii antivirale, probabil, este dependent de concentraţia extracelulară a interferonului, astfel că celulele învecinate celor producătoare de interferon devin cele mai rezistente la infecţia cu virus. Celulele mai îndepărtate sunt mai puţin protejate.

Eficienţa relativă a diferitelor mecanisme de apărare, inclusiv a celui mediat de interferon depinde de ruta pe care se răspândeşte virusul. De la poarta de intrare, virusul se diseminează spre organele ţintă, pe calea fluidelor organismului (sânge, limfă), prin leucocitele infectate sau pe cale axonală. Diseminarea pe cale sanguină şi limfatică este limitată de macrofagele asociate capilarelor sanguine şi limfatice. Viremia diminuă şi odată cu ea diminuă severitatea infecţiei. Experienţele cu administrare de interferon evidenţiază că interferonul circulant reduce viremia şi protejează organele ţintă. Interferonul este mai puţin eficient faţă de virusurile care se diseminează pe cale axonală.

La pacienţii hipogamaglobulinici, limitarea şi eliminarea infecţiei virale este rezultatul acţiunii interferonului, a reacţiei febrile a organismului, a răspunsului inflamator şi a imunităţii mediate celular.

Bazele moleculare ale activităţii interferonilor

Interferonii nu au activitate biologică în celulele care îi sintetizează. Principala lor activitate *–cea antivirală-* nu este directă, deoarece interferonii nu sunt molecule efectoare, ci *inductori ai stării antivirale.* Interferonii acţionează asupra celulelor neinfectate şi le induc starea de rezistenţă faţă de infecţie, influenţând multiplicarea virusurilor în diferite etape ale ciclului (de exemplu, transcrierea ARNm, traducerea etc.), în funcţie de sistemul celular.

După secreţia din celulele în care a fost sintetizat, interferonul se leagă de receptorul membranar al altor celule, unde funcţionează ca o citokină paracrină şi activează un set de gene specifice. Corespunzător celor două clase de interferoni, se cunosc două tipuri de receptori. Ambele sunt glicoproteine de membrană.

Complexele interferon-receptor sunt endocitate. Internalizarea lor declanşează evenimentele nucleare, al căror rezultat este starea antivirală şi apariţia unor modificări ale metabolismului celular.

Interferonii induc sinteza unor proteine, care mediază efectele lor multiple. Starea antivirală este, în primul rând, consecinţa sintezei în celulă, a unei *proteine inhibitoare a transcrierii şi/sau a traducerii mesajului genetic viral (PIT)*, care interferă fie cu sinteza ARNm viral, fie cu traducerea sa, fie cu ambele procese.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

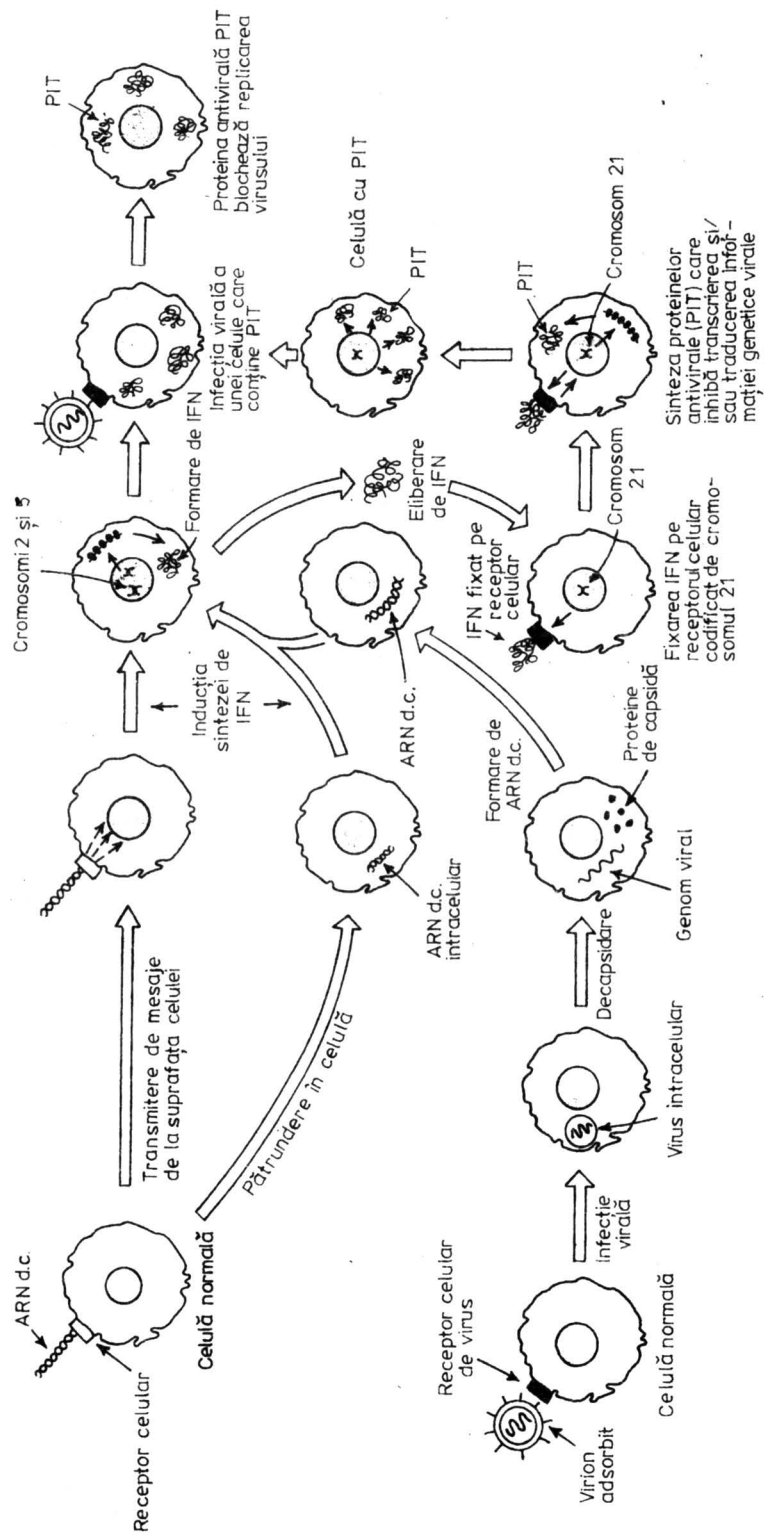


Fig. 171. Inducția sintezei și mecanismul acțiunii interferonilor, după ipoteza proteinelor antivirale care inhibă transcrierea și/sau traducerea genomului viral.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

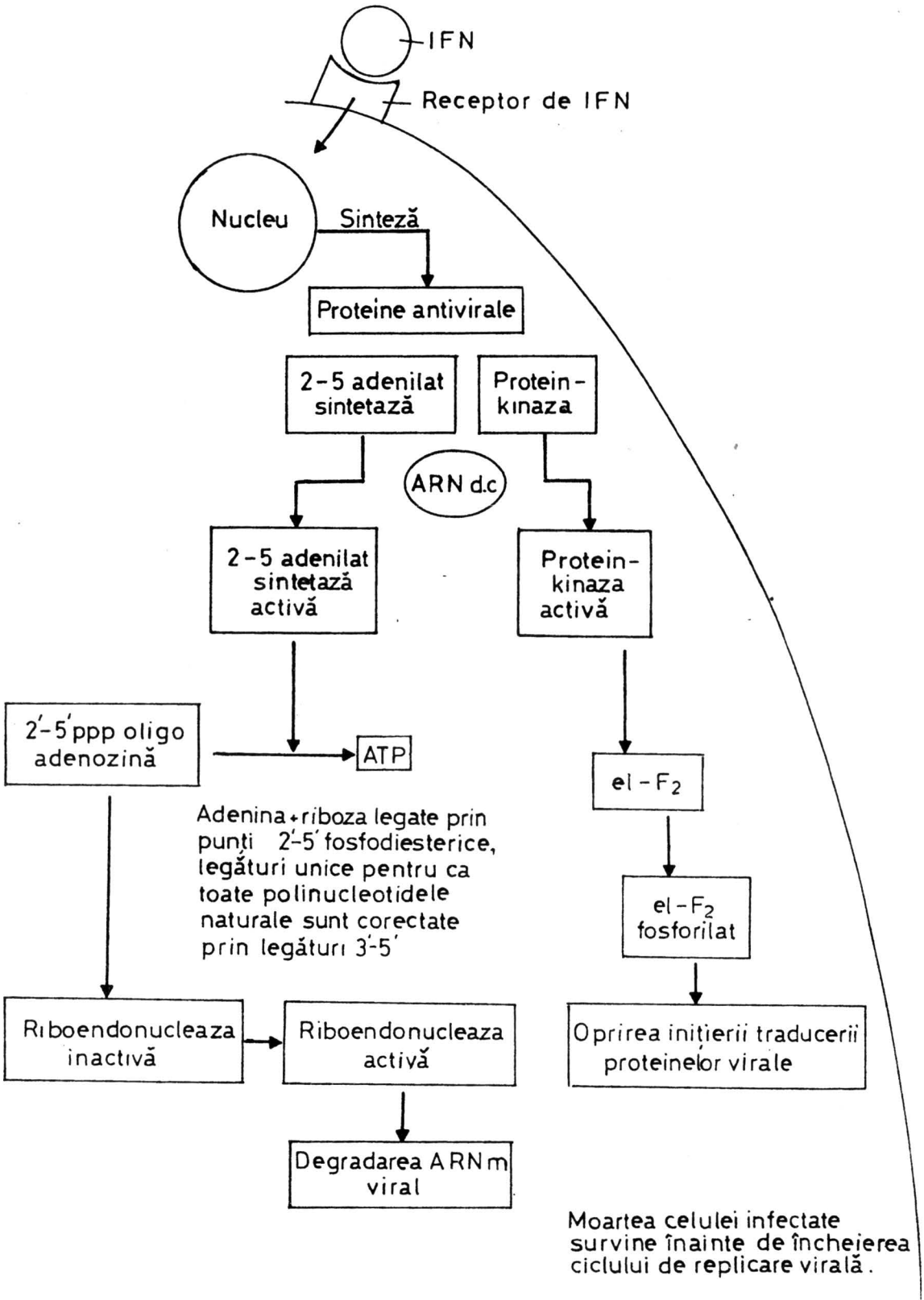


Fig. 172. Ilustrarea schematică a mecanismelor de acțiune a interferonilor (după Male și Cooke, 1985).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

In cele mai multe sisteme virus-celulă, inhibiţia multiplicării virale implică interferenţa cu etapa traducerii ARNm viral. In celulele liniei sensibile L (originară din fibroblaste de embrion de şoarece), infectate cu virus vaccinal, se produce dezagregarea polisomilor celulari. ARNm viral se asociază cu ribosomii eliberaţi şi formează polisomi ce sintetizează proteine specific virale. In celulele tratate cu interferon, înainte de infecţia virală, ARNm viral nu se asociază cu ribosomii şi nu se sintetizează proteine specifice. In absenţa proteinelor virale, infecţia este abortivă. Efectul este acelaşi după infecţia cu reo-, picorna-, toga-, rhabdo-, paramixo-, herpes- sau cu papovavirusuri.

In celulele tratate cu actinomicina D (un inhibitor specific al sintezei proteice), efectul protector al interferonului nu se realizează.

Efectul protector al interferonilor faţă de infecţia virală se produce şi prin alte mecanisme, cel mai important fiind *inducţia sintezei proteinelor antivirale*: adenilat-sintetaza şi o protein-kinază.

Protein-kinaza dependentă de ARN este o kinază serină/treonină, prezentă în celule şi în mod normal se sintetizează cu o rată foarte scăzută. Enzima, în proporţie de 20% se găseşte în nucleu (mai ales în nucleol) şi 80% are sediul citoplasmatic. In cea mai mare parte, protein-kinaza citoplasmatică este legată de ribosomi şi este mai fosforilată decât cea nucleară. Protein-kinaza este inactivă (latentă), dar poate fi activată de ARN dublu catenar. In celulele tratate cu interferon, nivelul protein-kinazei (o proteină de 67 kD) creşte de peste 20 de ori.

In celulă, protein-kinaza, în prezenţa ARN dublu catenar se asociază cu acesta, se activează şi se fosforilează. Protein-kinaza activată, poate fosforila un număr de substraturi celulare, inclusiv factorul 2 alfa, de iniţiere a sintezei proteinelor la eucariote (eIF-2 alfa), la restul de serină 51 (Kumar, 1998). EIF-2 alfa fosforilat, blochează iniţierea sintezei catenei polipeptidice.

Altă cale activată de ARN dublu catenar şi de interferon este calea 2',5'-oligoadenilat sintetaza/RN-aza L. 2',5'-adenilat sintetaza (2',5'-AS) catalizează sinteza 2',5'-oligoadenozinei. 2',5'-AS este activată datorită unei schimbări conformaţionale care se produce consecutiv legării sale cu ARN dublu catenar. 2',5'-AS activată este capabilă să polimerizeze ATP şi alte nucleotide în legături 2'-5'. In molecula de 2',5'-oligoadenozină, resturile de riboză sunt legate prin punţi fosfo-diesterice 2'-5'. Acestea sunt legături unice, deoarece toate polinucleotidele naturale conţin legături 3'-5'.

2',5'-oligoadenozina activează RN-aza L. RN-aza L poate cliva ARN celular şi viral monocatenar la secvenţe specifice UpA, UpG şi UpU. RN-aza L poate manifesta efecte antivirale prin inducţia apoptozei.

Cei mai buni interferoni stimulează sinteza interferonilor, care la rândul lor activează ambele enzime (adenilat-sintetaza şi protein-kinaza).

Interferonii au acţiune directă, prin inducerea modificărilor în *membrana plasmatică* a celulei, mărind rigiditatea stratului lipidic. Acesta poate fi mecanismul efectului inhibitor al interferonului asupra transformării maligne a celulelor, sub acţiunea virusurilor oncogene.

Alte activităţi biologice ale interferonilor. Interferonii exercită o gamă largă de acţiuni, cu efecte inhibitoare sau stimulatoare asupra celulelor sensibile

Efectele inhibitorii se exercită nu numai asupra multiplicării virusurilor, ci şi asupra creşterii şi multiplicării microorganismelor parazite cu localizare intracelulară, asupra unor activităţi metabolice tisulare (de exemplu, prin inhibiţia sintezei proteice, interferonul poate să inducă procese de necroză celulară), asupra multiplicării celulelor tumorale, asupra creşterii şi diviziunii celulelor normale, asupra reacţiilor de hipersensibilitate întârziată.

Efectele stimulatoare ale interferonilor se exercită asupra nivelului de exprimare a unor molecule de suprafaţă a celulelor (de exemplu, moleculele CMH, receptorii de mare afinitate pentru regiunea Fc a IgG pe suprafaţa macrofagului, cu consecinţe importante pentru rata eliminării complexelor imune prin fagocitoză şi asupra ADCC).

Interferonii stimulează activitatea citotoxică a limfocitelor NK şi activează metabolismul oxidativ al macrofagelor, precum şi activitatea lor antitumorală. Pe suprafaţa

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

limfocitelor T, interferonii intensifică exprimarea receptorilor pentru IL-2. Stimulează răspunsul imun, dacă este administrat concomitent cu antigenul. Efectul imunostimulator se poate atribui unei mai bune exprimări a moleculelor CMH, ceea ce condiţionează o prezentare mai eficientă a antigenului.

Semnificaţia biologică a interferonilor. Interferonii sunt componente ale reţelei citokinelor. Citokinele sunt molecule active, produse de diferite categorii de celule, sub acţiunea unor stimuli, inclusiv sub acţiunea interferonilor.

Citokinele interacţionează cu receptorii altor celule şi reglează procesele lor de proliferare şi diferenţiere. Deoarece limfocitele stimulate produc interferon gama, această clasă de molecule, este o *citokină* din categoria *limfokinelor*.

Adeseori, efectele biologice ale diferitelor categorii de citokine sunt antagonice. Homeostazia celulară este, probabil, rezultatul unui echilibru între efectele induse de o varietate de citokine.

Intre interferoni şi hormoni, există câteva asemănări, cu privire la mecanismul secreţiei şi eliminării din celulele producătoare, al interacţiunii cu celulele sensibile, al mecanismului de acţiune asupra celulelor (ca şi hormonii, interferonii activează ciclazele GMP şi AMP), precum şi în ceea ce priveşte efectele reglatoare şi modulatoare ale celor două categorii de molecule asupra reacţiilor imunitare.

Având în vedere aceste asemănări, s-a propus ca interferonii să facă parte din grupul hormonilor "neclasici", alături de *EGF* (*E*pidermal *G*rowth *F*actor), *PDGF* (*P*latelet *D*erived *G*rowth *F*actor), *NGF* (*N*erv *G*rowth *F*actor) etc.

Perspectivele producerii şi utilizării interferonilor.

In unele celule, sinteza interferonilor este indusă spontan, în absenţa unui inductor detectabil. Interferonii alfa şi gama sunt produşi de liniile celulare limfoblastice originare în celulele T, în concentraţii variabile, de la 1 la 1000 U/ml.

Interferonii sunt produşi prin *biotehnologii* moderne, în celule manipulate genetic. Genele codificatoare ale sintezei interferonilor au fost izolate, secvenţiate şi inserate în vectori de clonare. Aceştia au fost transferaţi în celula procariotă (*E. coli*), sau eucariotă. Genele codificatoare ale interferonilor sunt transcrise atât în celule bacteriene, cât şi în celule eucariote. Pe această cale, *in vitro* sau obţinut cantităţi mari de interferoni (utilizabili în clinică), fiind sintetizaţi de celulele bacteriene, de levuri şi de celulele de mamifere.

Interferonii se utilizează pe scara largă în tratamentul infecţiilor cu virus rabic şi cu virusuri encefalitogene. Efectul lor este ameliorarea sau chiar eliminarea infecţiilor persistente, cu virusul hepatitei B, C, cu herpes-zoster sau cu citomegalovirus.

Interferonii au proprietăţi antiproliferative şi se folosesc în tratamentul unor stări neoplazice umane. Tumorile originare în limfocitele B sau în celulele plasmocitare sunt cele mai sensibile. Cea mai eficientă activitate antiproliferativă o are interferonul alfa. Varietatea gama este activă în maladia Hodgkin (proliferarea malignă a macrofagelor ganglionare).

Utilizarea interferonilor în clinică este limitată de manifestarea unor efecte secundare: febră, hipotensiune, mialgie, tahicardie.

Bacteriofagii

Bacteriofagii sunt virusuri care parazitează celulele bacteriene (eubacterii). Cel mai adesea, rezultatul interacţiunii este *liza* celulei gazdă. Fenomenul lizei transmisibile a bacteriilor a fost descoperit de Twort (1915) şi l-a atribuit unei enzime litice sau unui virus. D'Herelle (1917) a descoperit independent fenomenul lizei bacteriene, a demonstrat natura particulată a agentului inductor şi l-a denumit *bacteriofag* ("mâncător de bacterii") sau prescurtat, *fag*. Virusurile care infectează diferite grupe de microorganisme poartă denumiri derivate de la grupul de organisme gazdă: actinofagi (pentru actinomicete), cianofagi (pentru cianobacterii), micofagi (infectează ciupercile microscopice).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

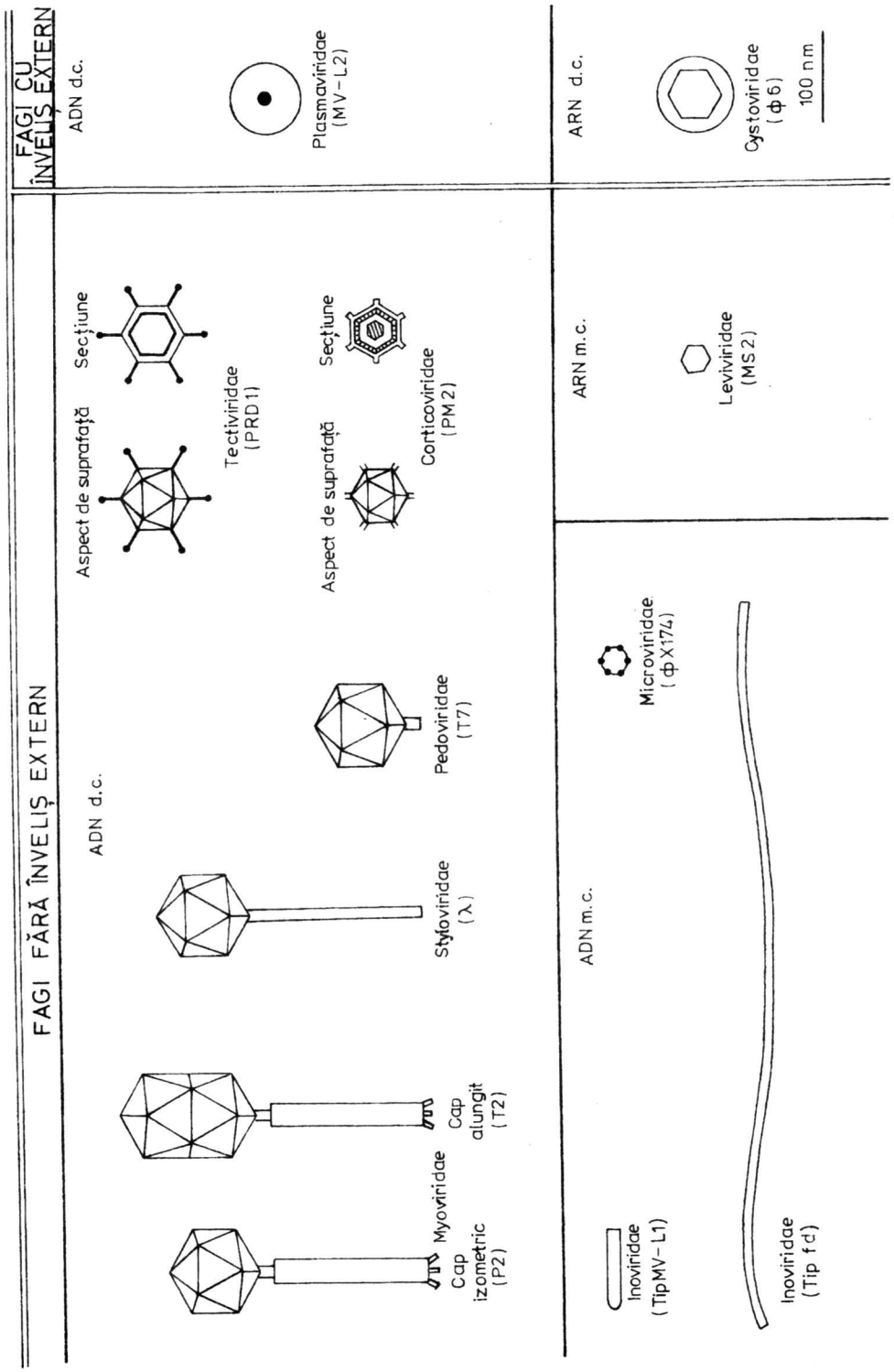


Fig. 173. Principalele tipuri structurale de bacteriofagi.

Se disting trei tipuri morfologice de fagi:

- fagii în formă de cireașă cu coadă (au cap și coadă de lungimi diferite, flexibilă sau rigidă);
- fagii filamentoși
- fagii sferici, fără coadă.

Cei mai studiați și mai bine cunoscuți ca structură moleculară sunt fagii din seria T, în special din grupul T-par (T_2, T_4, T_6) și fagul λ, (infectioși pentru *E. coli*), fagul ϕ X 174.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Studiul fagilor la nivel molecular a fost iniţiat în anii '40 de către M. Delbruck. Particula fagică matură din seria T-par, are greutatea moleculară de 2,2 x 10^8 D şi este alcătuită din ADN şi proteine, în proporţie de 40 şi respectiv 60%.

Simetria fagului T_4 este binară: la nivelul capului, capsomerele sunt aşezate după o simetrie icozaedrică, iar la nivelul cozii, după o simetrie helicală.

Capul fagului T_4, la microscopul electronic, pe preparatele umbrite are formă poliedrică, iar în secţiune longitudinală, are un contur hexagonal. Are o lungime de 100 μm şi lăţimea de 65 μm.

Forma geometrică exactă a capului, nu este cunoscută, deoarece capsomerele nu se observă în structura sa intactă, ci numai după dezintegrarea parţială. Pe baza formei umbrelor virionilor în preparatele umbrite, capul este descris ca o prismă hexagonală bipiramidală. Cele două piramide sunt decalate una faţă de altă cu un unghi de 30°. Din cauza decalajului, ar rezulta o configuraţie geometrică, denumită *antiprismă hexagonală bipiramidală.*

In interiorul capului se găseşte genomul fagic, o moleculă de ADN dublu catenară, lineară, cu o lungime de circa 50 μm şi aproximativ 200 de gene, "împachetată" foarte strâns. Genomul, în interiorul capsidei, s-ar afla sub acţiunea unei presiuni, care ar facilita injectarea lui în celula bacteriană. In interiorul capsidei, alături de genom, se găsesc şi alte tipuri de molecule:

- o proteină internă (300 – 1000 de molecule), cu greutate moleculară mică;
- un polipeptid acid (1000 – 3000 de molecule);
- două tipuri de poliamine (spermidina şi putrescina).

La vârful uneia din piramide, se găseşte un mic "dop proteic", care face legătura între capsidă (cu axe de simetrie de tip 5 şi 2) şi gât, cu o structură simplă de tub cilindric, cu simetrie helicală. Gâtul ar avea rolul de "adaptor de smetrie"

Gulerul are forma unei plăci hexagonale, cu un orificiu în zona centrală, străbătut de *cilindrul axial al cozii*, situat în continuarea gâtului.

Cilindrul axial al cozii are un diametru de 7,5 μm şi un lumen canalicular de 2 μm. Prin acest canal, ADN fagic este transferat în celula bacteriană. In jurul cilindrului axial este asamblată *teaca contractilă a cozii.* Cilindrul axial este mai lung decât teaca cozii şi de aceea proemină în raport cu ea, având rolul de a perfora peretele celulei bacteriene.

Teaca contractilă a cozii cuprinde 144 de capsomere, dispuse pe 24 de rânduri, după o simetrie helicală. Prin contracţie, teaca se scurtează, datorită reaşezării spaţiale a capsomerelor şi eliberează cilindrul axial pe o lungime de circa 50 μm, permiţându-i să perforeze peretele celulei bacteriene.

La extremitatea cozii se găseşte *placa bazală*, cu aspectul uni disc hexagonal, cu diametrul de 40 μm. Placa bazală este formată dintr-un pivot central şi 6 subunităţi aşezate după o simetrie radială de tip 6. Orificiul central al pivotului este străbătut de cilindrul axial al cozii. Placa este prevăzută cu 6 cârlige, denumite *croşetele cozii*, câte unul la fiecare vârf al hexagonului. Rolul croşetelor este acela de a fixa ferm particula fagică pe suprafaţa celulei bacteriene.

Fibrele cozii, în număr de 6, sunt structuri filamentoase proteice, lungi de 130 μm şi par a fi alcătuite din 4 subunităţi identice. Cu una din extremităţi, fiecare fibră se fixează la unul din vârfurile placii hexagonale, iar cu extremitatea distală se leagă slab de subunităţile gulerului, formând astfel învelişul extern al cozii, în jurul tecii contractile. In perioada premergătoare fixării, fibrele se desprind din inserţia lor distală pe guler şi rămân legate numai de structura plăcii bazale. Fibrele cozii ar avea rolul unor structuri de ancorare a particului virale de peretele bacterian, în cursul interacţiunii primare.

Genomul fagic. Fagii cei mai mici, denumiţi fagi ARN "masculi" (Q-beta, MS_2 şi f_2) au genomul format dintr-o moleculă de ARN monocatenar, de circa 3,5 x 10^3 baze, cu topologie lineară. Adeseori, molecula de ARN formează structuri secundare, prin intermediul punţilor de H care reunesc 60-80% din totalul bazelor. Se formează astfel structuri dublu catenare în "ac de păr" ("hairpin").

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

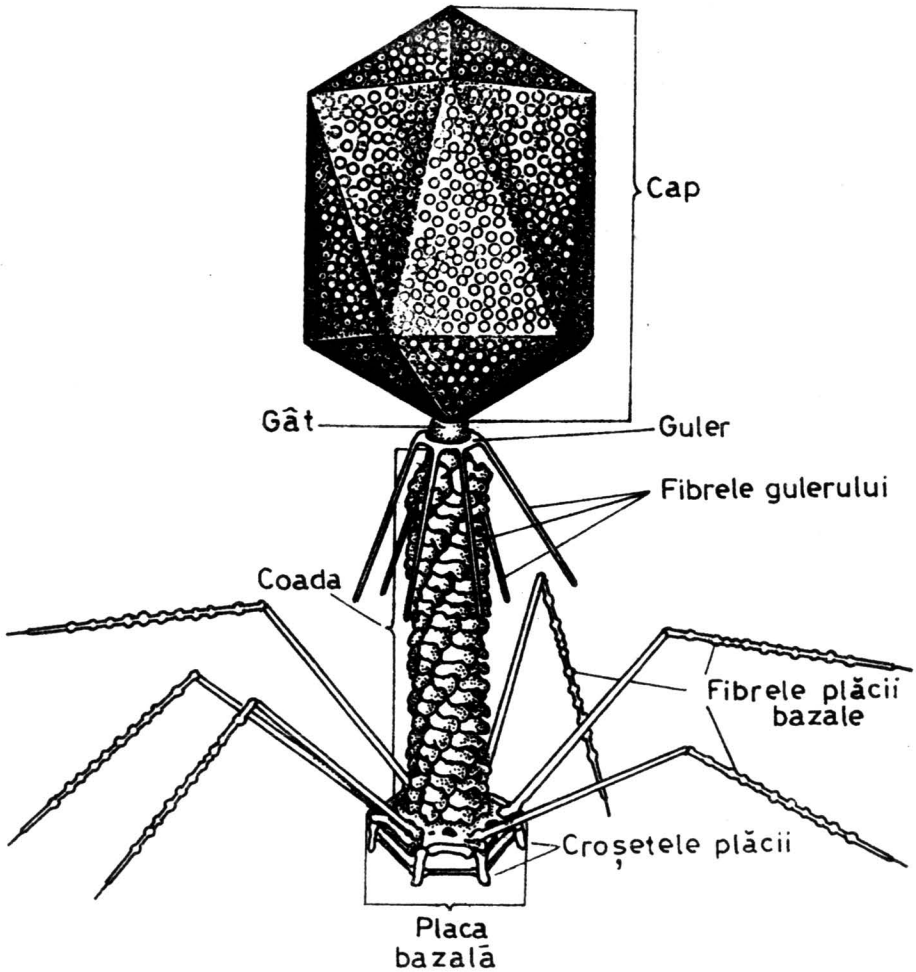


Fig. 174. Anatomia bacteriofagului T_4.

Fagii filamentoşi (M_{13}, f_1, fd) şi cei cu simetrie icozaedrică de formă sferică, fără coadă (ϕ X 174 etc) au genomul format dintr-o moleculă de ADN monocatenară, circulară.

Fagii din seria T-par (T_2, T_4, T_6), T-impar (T_1, T_3, T_5, T_7), fagul λ, P_2 au genomul format dintr-o moleculă de ADN dublu catenară, lineară.

Există deosebiri sub raportul structurii secvenţelor terminale ale moleculei de ADN. Astfel, la fagii λ, P_2 (cu genom ADN dublu catenar, linear), ambele extremităţi se termină cu secvenţe monocatenare, complementare unele faţă de altele, astfel încât formează capete *aderente, coezive* sau "lipicioase". Prin legarea celor două extremitaţi, pe baza complementarităţii, genomul fagului, liber în celula gazdă, se circularizează.

Fagii din seria T-impar au ca genom, o moleculă de ADN dublu catenară lineară, iar la extremităţi, au secvenţe nucleotidice repetate, de la 250 la 10 000 de baze. Moleculele de ADN genomic ale unei populaţii de virioni au un aranjament unic al genelor şi aceleaşi secvenţe repetate terminal.

La fagul T_4, secvenţa nucleotidelor în genomul diferitelor particule virale ale unei populaţii este defazată cu un număr determinat de baze, deoarece în capsidă este împachetată o moleculă de ADN mai mare decât genomul propriu-zis. De exemplu, dacă într-o moleculă de ADN genomic, secvenţa nucleotidelor este ABCD.... XYABCD, în altele secvenţa este DEF..... XYZABCDE. Toate moleculele de ADN genomic conţin aceiaşi secvenţă de nucleotide, dar secvenţele iniţiale ale genomului sunt diferite de la un virion la altul şi un număr de nucleotide se repetă la extremitatea opusă a genomului. Fenomenul decalării unei secvenţe unitare de baze, de la un genom la altul, se numeşte *permutare ciclică*.

Genomul fagului T_4 conţine circa 200 de gene. Peste 50 dintre ele au rol în procesul asamblării, iar celelalte codifică diferite proteine cu rol în ciclul de replicare. O mică parte

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

dintre genele de replicare sunt esenţiale, iar restul sunt neesenţiale, deoarece au corespondent printre genele cromosomului bacterian. Fenomenele mutaţionale ale genelor neesenţiale nu blochează desfăşurarea ciclului de replicare, dar randamentul este net inferior (se asamblează un număr mai mic de fagi progeni).

Informaţia genetică a bacteriofagilor, ca şi a celulelor bacteriene are caracter continuu, adică, de regulă lipsesc secvenţele necodificatoare. Câteva gene ale fagului T_4 conţin câte un intron de circa 1000 pb (de exemplu, gena timidilat-kinazei).

Genomul fagic se deosebeşte de al virusurilor infecţioase pentru celulele animale, nu numai prin particularităţile structurale, ci şi prin conţinutul în baze neobişnuite: 5-hidroxi-metil-citozina, în locul citozinei la fagii din seria T-par sau 5-hidroxi-metil-uracil şi 5-4,5-dihidroxi-pentil-uracil.

Genomul fagului T_4 este "imun" faţă de enzimele de restricţie ale celulei bacteriene, ceea ce îi permite desfăşurrarea ciclului de replicare.

Relaţiile fag-bacterie

Studiul relaţiilor fag-bacterie a adus o contribuţie majoră la fundamentarea şi evoluţia biologiei moleculare. Studiile privind interacţiunile fag-bacterie au fundamentat următoarele concepte:

- inducţia sintezei enzimelor codificate de fagi;
- colinearitatea genă-proteină
- natura nesuprapusă a codului genetic
- mecanismul semiconservativ al replicării ADN
- existenţa fenomenelor de restricţie şi modificare la bacterii
- mecanismul traducerii informaţiei genetice
- mecanismele mutagenezei şi fenomenele reparatorii
- reglarea activităţii celulare
- mecanismele oncogenezei virale.

Istoria cercetărilor interrelaţiilor fag-bacterie se confundă (până în anii '70), cu însăşi istoria biologiei moleculare.

De cele mai multe ori, infecţia unei culturi bacteriene sensibile, cu preparatul fagic corespunzator, evoluează în sensul sintezei constituienţilor fagici, al asamblării şi eliberării fagilor progeni, rezultatul fiind *liza* celulei bacteriene.

Studiul multiplicării fagilor a început odată cu evidenţierea formării plajelor de liză, într-o pânză de celule bacteriene, crescute pe suprafaţa unui mediu agarizat. Fiecare plajă de liză este iniţiată prin multiplicarea unei singure particule virale fagice şi este rezultatul repetării ciclului litic al infecţiei fagice, în perioada de creştere a celulei bateriene.

O altă modalitate de evoluţie a interacţiunii fag-bacterie este caracteristică fagilor temperaţi şi corespunde fenomenului de *lizogenie*. In interacţiunea de tip lizogen, genomul viral se integrează în structura cromosomului bacterian, devenind parte integrantă a acestuia şi se comportă ca gene cromosomale.

Ciclul litic al interacţiunii fag-bacterie. Multiplicarea bacteriofagului

Multiplicarea fagului are loc într-o serie de etape, identificate iniţial pentru cuplul fag T_4- *E. coli*. Intelegerea lor a avut un rol esenţial pentru studiile privind interacţiunea dintre virusuri şi celulele animale.

Multiplicarea propriu-zisă este precedată de stabilirea contactului fizic dintre fag şi celula sensibilă.

Adsorbţia şi fixarea fagului sunt rezultatul ciocnirilor întâmplătoare dintre particula fagică şi celula bacteriană, a căror frecvenţă depinde de densitatea lor relativă. La densitatea de 10^8 bacterii/ml şi 10^7-10^9 fagi/ml, în câteva minute, 90% dintre fagi se adsorb pe suprafaţa bacteriilor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru fixarea fagilor din seria T-par, un rol esenţial par să-l aibă croşetele plăcii bazale, deoarece distanţa dintre placa bazală şi peretele celular nu este niciodată mai mică de 5 nm. Fixarea particulei fagice pe celula bacteriană, depinde de existenţa, la suprafaţa celulei, a unor structuri chimice complementare denumite *receptori de fag*. Prezenţa lor s-a evidenţiat pe mmbrana externă a peretelui celular şi pe stratul capsular la bacteriile Gram negative, pe peretele bacteriilor Gram pozitive, pe flageli şi pe pili.

Pilii au receptori diferiţi pentru două tipuri de fagi: pentru fagii ARN "masculi" şi pentru cei filamentoşi.

S-au descris trei mecanisme principale de legare a fagilor, pe suprafaţa celulei bacteriene:

- fagii cu coadă contractilă din seria T, se fixează reversibil, prin intermediul fibrelor cozii, pe lanţurile lipopolizaharidice ale bacteriilor Gram negative, sau de complexele de acizi teichoici, legate covalent de peptidoglican, la cele Gram pozitive. Fibrele cozii fagului T_4, prin capătul lor distal, realizează o interacţiune înalt specifică cu resturile glicozil ale lipopolizaharidului din membrana externă a peretelui de *E. coli*. Fixarea ireversbilă este rezultatul legării croşetelor plăcii bazale, cu receptorii celulei;

- fagii cu coadă necontractilă, se leagă de componenta glucidică a receptorilor lipopolizaharidici ai membranei externe a peretelui celular. Imediat după aceea, are loc degradarea parţială a receptorilor sub acţiunea unei endoglicozidaze virale. De obicei, capsula bacteriană blochează fixarea fagilor pe structurile subiacente, dar uneori, fagii se leagă de receptorii capsulari şi infectează celula, după degradarea parţială a polizaharidelor;

- fagii icozaedrici ARN "masculi" se leagă pe suprafaţa pilului. Sinteza proteinei componente a pilului (pilina) şi asamblarea ei sunt codificate de plasmida F. Pilul este o structură caracteristică numai celulelor bacteriene cu potenţialitate de donor de material genetic şi de aici derivă denumirea de fagi "masculi";

- fagii filamentoşi se fixează la extremitatea pilului, prin intermediul unei proteine a capsidei virale, denumită *proteina A* (*Attachment*, engl. = ataşare). Nu se cunoaşte mecanismul prin care genomul fagilor ARN "masculi" sau filamentoşi ajunge în celula bacteriană. Este puţin probabil ca pilul să aibă rol de "conductor" al genomului fagic. Se pare că pilul se retractă şi astfel fagii sunt orientaţi până la un receptor al suprafeţei celulare.

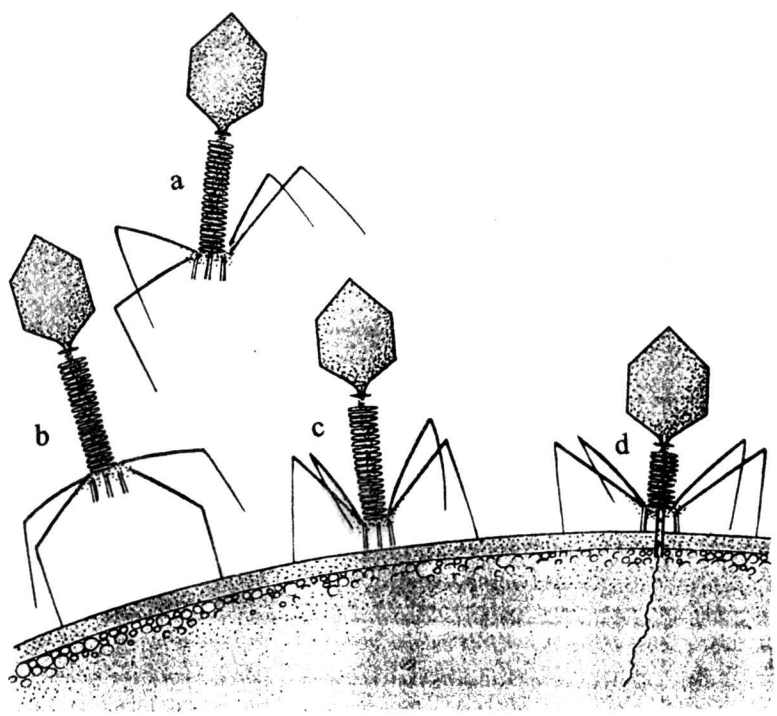


Fig. 175. Ataşarea bacteriofagului T_4 de peretele celular al E. coli şi injectarea ADN. a. Virion neataşat. b. Ataşarea virionului prin fibrele cozii. c. Fixarea ireversibilă prin intermediul croşetelor plăcii bazale. d. Contracţia tecii cozii şi injectarea ADN (după Brock, 1988).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După fixarea ireversibilă de receptorii celulei bacteriene, fagii din seria T-par, prin intermediul cozii contractile, o structură foarte specializată, "injectează" genomul în citoplasma celulei.

Capsida fagică are rolul de a proteja genomul. In cursul infecţiei celulei sensibile, ea rămâne în întregime la exterior, îndeplinind rolul unei microseringi, adaptată să injecteze genomul fagic în celulă.

După fixarea pe suprafaţa celulei bacteriene, placa bazală îşi schimbă conformaţia şi induce o modificare a modului de aranjare a subunităţilor componente ale tecii cozii. Ca urmare, teaca se contractă şi se scurtează, uşurând pătrunderea cilindrului axial al cozii, prin peretele celular, cu o lungime de circa 12 nm. ADN din capul fagului, trece în celulă pe calea cilindrului axial tubular.

Mecanismul injectării genomului fagic nu este explicat satisfăcător. Membrana internă şi cea externă, fuzionează într-un punct, sub acţiunea presiunii pe care o exercită vârful cilindrului axial al cozii. Pătrunderea acidului nuclei viral prin punctul de fuziune a membranelor nu necesită pori specifici sau proteine canaliculare, pentru că ADN nu traversează membrana propriu-zisă şi nici spaţiul periplasmic (Dreiseikelmann, 1994). Ulterior, canalul membranar se închide cu proteinele "pilot", ataşate la extremitatea proximală a ADN, cu rol în specificitatea şi eficienţa translocaţiei ADN prin membranele celulei.

Nu se cunoaşte natura factorilor care fac ca injectarea să se realizeze într-un interval foarte scurt (circa 15 secunde). Unii autori consideră că, în interiorul capsidei, ADN fagic este pliat şi "împachetat" foarte strâns, ceea ce ar crea o presiune considerabilă. La aceasta s-ar adăuga presiunea produsă de agitaţia termică a moleculelor mari, existente în capul fagului. Datorită acestei presiuni, în momentul contracţiei cozii şi al scoaterii "dopului" care închide capsida, ADN ar fi propulsat energic în celula bacteriană. Concomitent cu genomul, trec moleculele legate ionic de ADN: mici cantităţi de proteine, oligopeptide bazice, poliamine.

Genomul fagic ar fi orientat spre celula bacteriană, de molecule proteice "pilot" existente în capsidă. După unii autori, în procesul transferului genomului fagic, celula bacteriană ar fi pasivă, iar după alţii, ar exercita un efect de aspiraţie, care ar facilita pătrunderea genomului fagic.

Infecţia fagică a celulei bacteriene, determină o reorganizare profundă a activităţii sale biologice. Rezultatul interacţiunii, de cele mai multe ori, este subordonarea întregului aparat de biosinteza celulară, în scopul producerii constituienţilor virali.

Din momentul în care genomul fagic a pătruns în celulă şi se găseşte liber, starea sa este aceea de *fag vegetativ*, capabil de transcriere şi replicare. Genele fagice nu sunt transcrise simultan, ci după un program bine coordonat. Programul transcrierii genelor fagice se desfăşoară în două etape: *timpurie* şi *tardivă*, separate în raport cu intervalul replicării genomului.

Prgramul *timpuriu* al genomului fagic codifică următoarele categorii de *proteine precoce* (timpurii):

- *proteine de membrană*, destinate să "astupe" discontinuităţile produse de cozile fagilor multipli care se fixează pe celula sensibilă;

- *proteine-enzime (nucleaze)* care degradează cromosomul bacterian. Endonucleaza *A* creează breşe monocatenare la secvenţele cu citozină, iar endonucleaza *B* atacă secvenţele monocatenare care conţin citozină. Rezultă astfel, mici fragmente de ADN dublu catenare, degradate ulterior până la nucleotide. Sinteza ARNm celular este blocată şi imediat survine stoparea sintezei proteinelor celulare, deoarece ARNm bacterian are un timp de înjumătăţire foarte scurt. Astfel, ribosomii bacterieni devin disponibili pentru traducerea ARNm fagic;

- proteine care catalizează sinteza bazelor specifice compoziţiei ADN fagic (5-hidroxi-metil-citozina);

- *proteine reglatoare* ale transcrierii ADN fagic. ARNm viral timpuriu este transcris de ARN-polimeraza bacteriană, iar sinteza ARNm tardiv este catalizată de proteine virale. Unii fagi inactivează ARN-polimeraza celulară şi codifică sinteza unei ARN-polimeraze timpurii proprii;

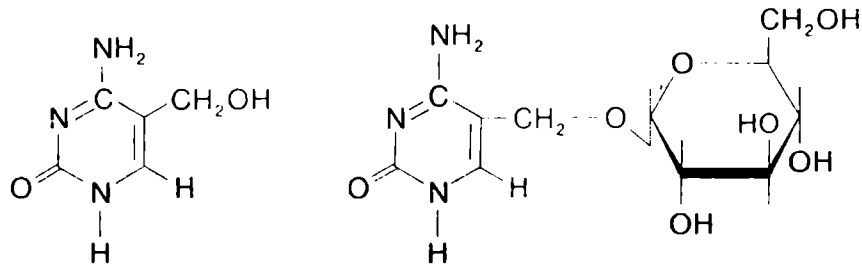
- enzime care catalizează *replicarea ADN* fagic: ADN-polimeraza, polinucleotid-ligaza.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Replicarea genomului fagic este mai bine cunoscută pentru fagii T_4 şi λ. Sursa nucleotidelor pentru sinteza ADN-T_4 este degradarea ADN celular, proces care este catalizat de endonuclezele *den A* şi *den B*, codificate de fagul T_4. Ele sunt active numai asupra ADN care conţine citozina. ADN celular este degradat la fragmente scurte dublu catenare, iar o exonuclează fagică desăvârşeşte procesul până la dezoxi-mononucleotid-trifosfaţi (dNMP).

Sinteza 5-hidroxi-metil-citozinei (HMC) este catalizată de două enzime fagice. Celula bacteriană nu are enzimele necesare sintezei acestei baze. In sinteza ADN T_4 trebuie prevenită încorporarea citozinei, deoarece o astfel de moleculă este substratul endonucleazelor fagice care degradează ADN bacterian. Fagul trebuie să codifice sinteza enzimelor care să prevină încorporarea C, în molecula de ADN.

E. coli posedă o endonuclează care atacă secvenţele de nucleotide ce conţin hidroxi-metil-citozina (HMC). Pentru a preveni degradarea ADN-T_4 (cu HMC), resturile de HMC sunt glicozilate sub acţiunea catalitică a două enzime fagice (alfa-glicozil-transferaza şi beta-glicozil-transferaza). Glicozilarea este o modificare post-replicativă, iar endonucleaza bacteriană este inactivă faţă de ADN-glicozilat.



5-hidroximetilcitozina (HMC)

HMC glicozilata

Fig. 176. 5-hidroximetil-citozina neglicozilată şi glicozilată. Dacă gruparea CH_2OH este înlocuită de H, rezultă citozina.

ADN fagic, iniţial, se replică după modelul semiconservativ bidirecţional, al *cercului simplu*. Se sintetizează copii ale genomului care vor fi transcrise pentru sinteza proteinelor tardive. Intr-o fază ulterioară, ADN fagic se replică după modelul *cercului rotativ*. Rezultă o moleculă *poligenomică* de ADN (genomuri multiple asociate în conexiunea cap-coadă) sau un *genom concatemer*, care ulterior este clivat de o endonuclează, în molecule de lungimea normală a genomului parental, ce vor fi încorporate în capsidă, în procesul morfogenezei.

Sinteza proteinelor tardive, devine predominantă după circa 20 de minute, când ADN a atins rata maximă de replicare şi transcriere a genelor timpurii este stopată. Peste 80% din ARNm viral tardiv este transcris de pe catena "r " (right) a genomurilor progene rezultate din replicare. Restul este transcris din catena complementară. Proteinele tardive sunt grupate în trei categorii:

- majoritatea sunt *proteine structurale*, care intră în alcătuirea capului, cozii şi anexelor ei;
- *proteinele de morfogeneză* (sau de asamblare). Cele mai importante sunt proteinele de "cofraj". Ele sunt definite ca proteine necesare în timpul asamblării unei structuri, dar care lipsesc din produsul final al asamblării (virionul);
- *proteinele enzimatice,* necesare lizei celulei bacteriene şi eliberării fagilor progeni. Ele includ o *muramidază* de tipul lizozimului, care hidrolizează mureina peretelui bacterian şi *o lipază* (holina), care atacă membrana plasmatică a celulei, uşurând accesul lizozimului spre structura parietală. Liza celulei este condiţionată de acumularea acestor proteine.

Asamblarea şi morfogeneza fagului s-a studiat la mutante fagice defective, care produc numai capete, numai cozi sau numai fibre. Capsida fagică are o arhitectură complexă şi principiul autoasamblării nu este funcţional. S-au identificat 4 linii separate de asamblare a subunităţilor structurale majore ale fagului: linia capetelor, a cozilor, a fibrelor şi a proteinei 63, care catalizează legarea fibrelor la nivelul plăcii bazale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

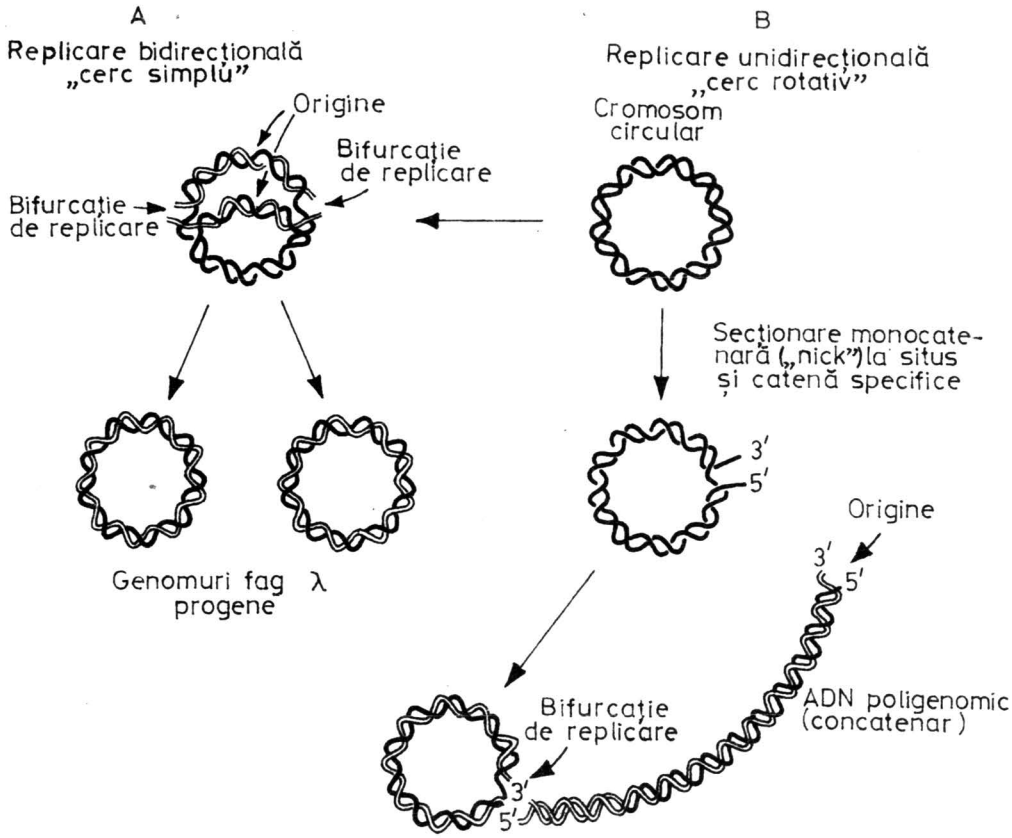


Fig. 177. Mecanismul replicării ADN al fagului λ în cursul infecției litice. A. Inițial, replicarea se face după modelul „cercului simplu" (sinteză, bidirecțională față de punctul de origine a replicării). B. Pentru asamblarea fagilor progeni, replicarea genomului se face după modelul „cercului rotativ" (după Wateon, 1977).

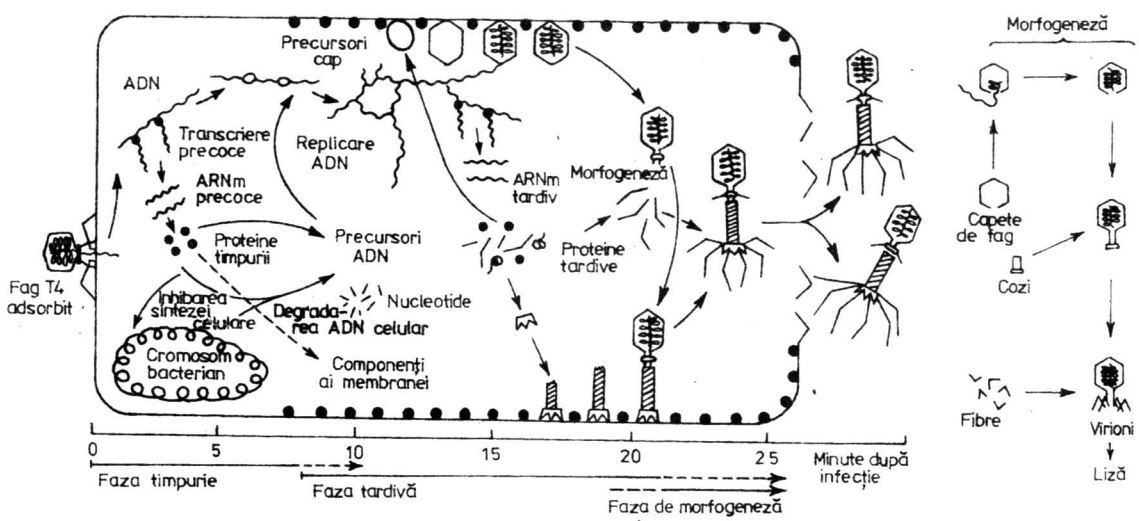


Fig. 178. Reprezentarea schematică a etapelor replicării fagului T_4.

Mai mult de 50 de gene ale fagului T_4 sunt implicate în morfogeneză. Ele codifică proteinele structurale, dar și pe cele nestructurale, necesare asamblării.

Prima regulă a asamblării, este că procesul se face pe *module structurale*. Capetele și cozile sunt primele care se asamblează și formează complexe vizibile la microscopul electronic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ulterior, fibrele cozii se adaugă acestor complexe. Avantajul asamblării fagului pe mai multe module, este acela că subunităţile cu erori pot fi eliminate timpuriu, separat la fiecare linie.

A II-a regulă este că asamblarea se face de la capătul terminal, spre punctul de joncţiune cu restul virionului. De exemplu, pentru asamblarea cozii, primele sunt produse plăcile bazale, apoi cilindrul axial, iar în final, teaca.

In procesul asamblării capului, prima structură care se formează se numeste *precap tip I*, ce se asamblează pe o structură proteică centrală, formată din proteinele de "cofraj", pe care sunt inserate capsomerele şi nu conţine ADN. Aceasta structură este convertită în *precap de tip II*, de asemenea lipsit de ADN, dar mai consolidată prin apariţia legăturilor chimice între capsomere. Structura capului îşi dobândeşte proprietăţile structurale şi funcţionale depline, înainte de pătrunderea ADN.

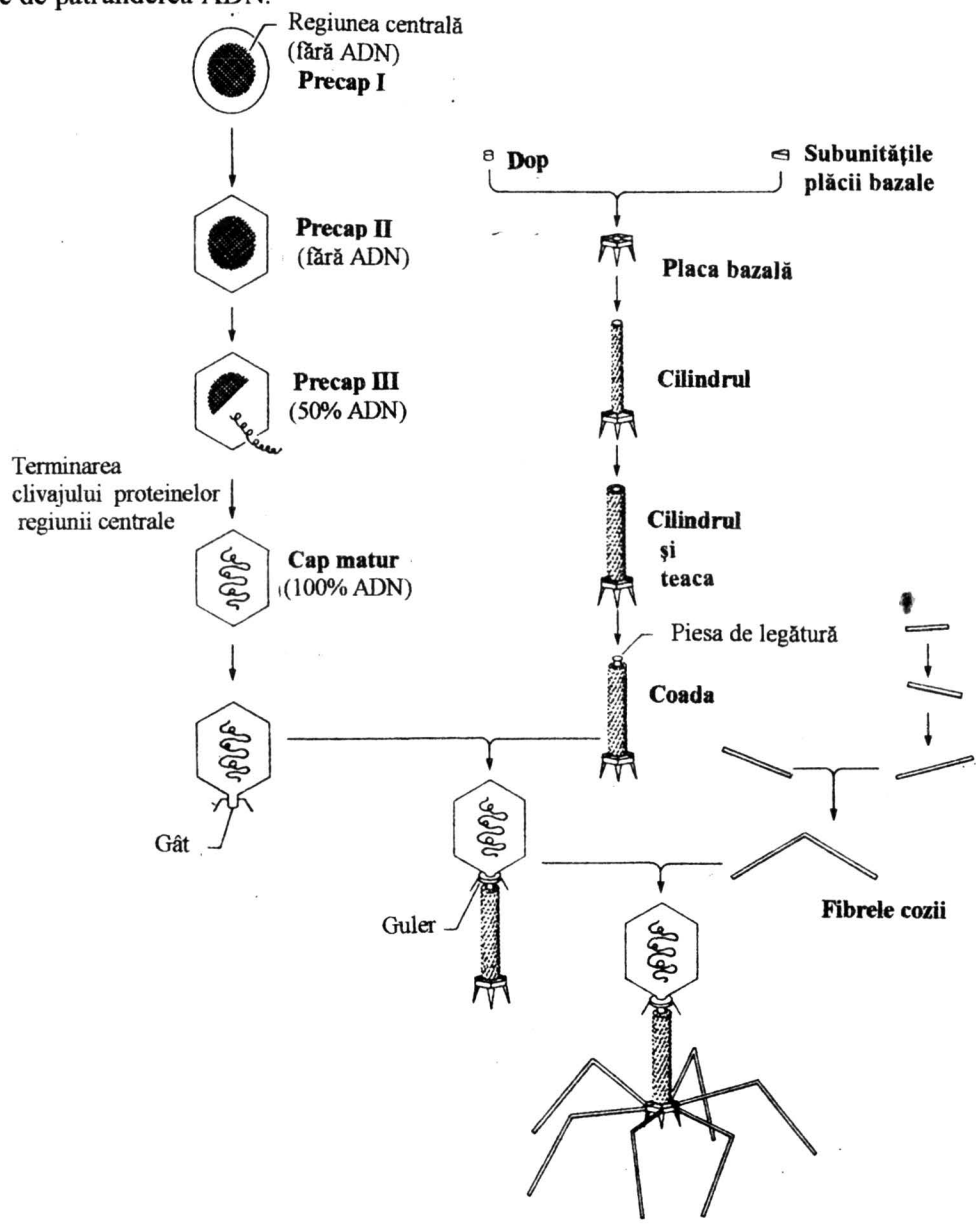


Fig. 179. Ilustrarea schematică a mecanismului asamblării faguluii T_4. Asamblarea fagilor se face pe trei module: cap, coadă şi fibrele cozii (după Davis, 1990).

Impachetarea ADN, începe prin legarea unui capăt al moleculei de ADN poligenomic (concatemer), de o proteină a capului fagic. Molecula de ADN s-ar rula pe un ax proteic, într-un mod particular, de la exteriorul spre interiorul axului. ADN pătrunde pe la unul din vârfurile icozaedrului, după dislocarea unei capsomere. La acelaşi vârf se asamblează coada.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Poliaminele şi o proteină de condensare au rol în împachetarea ADN. Molecula de ADN este secţionată din concatemerii rezultaţi în replicare. In capul fagului T_4 intră o cantitate de ADN mai mare decât un genom complet (102%). Din această cauză, în timpul împachetării ADN, secţionările din concatemeri nu se fac la o secvenţă unică de baze, ci la poziţii determinate de cantitatea de ADN ce intră într-un cap. Probabil, capătul liber al moleculei intră în capul fagic şi continuă până la umplere, după care concatemerul este secţionat. Acesta este mecanismul "capului plin". Secvenţa terminală împachetată este duplicată faţă de secvenţa care a intrat iniţial, adică ADN este *redundant terminal*.

Permutarea ciclică este o proprietate a populaţiei de fagi, iar redundanţa terminală este o proprietate individuală a moleculelor de ADN fagic.

Pe măsură ce genomul este încorporat în capsidă, proteinele de "cofraj" sunt eliminate prin spaţiile dintre capsomere. Capul matur are un volum cu 40-100% mai mare decât al precapului.

Pe măsură ce morfogeneza progresează, fagii maturi se acumulează în celula bacteriană. Cromosomul bacterian pierde treptat coordonarea activităţii celulare şi apare un dezechilibru funcţional profund. Muramidaza se sintetizează foarte timpuriu, la 8 minute după infecţie, dar este ineficientă atâta timp cât celula este fiziologic activă. Enzima secţionează moleculele de mureină, dar celula activă repară leziunile. Când leziunile nu mai pot fi reparate în ritmul producerii, celula se lizează exploziv şi eliberează fagii progeni. Liza celulei necesită acţiunea sinergică a două produse genice: *lizozimul şi holina* (o lipază). Holina creează breşe în membrana internă, permiţând lizozimului să ajungă la structura sensibilă.

Fiecare virion progen poate să infecteze o nouă celulă. Repetarea de mai multe a ciclului litic pe o pânză de celule sensibile, produce o *plajă de liză*. Plaja de liză este echivalentul unei *colonii de fagi*.

Dacă cultura bacteriană a crescut într-un mediu lichid, fagii determină liza celulelor, astfel încât suspensia bacteriană se clarifică, mergând până la sterilizare.

Fagii icozaedrici cu genom ADN monocatenar, sunt totdeauna virulenţi ca şi cei cu genom ADN dublu catenar şi lizează celula în circa 30 de minute.

Fagii filamentoşi nu lizează celula. Ea continuă să crească, să se dividă şi să elimine câteva sute de virioni la fiecare generaţie celulară.

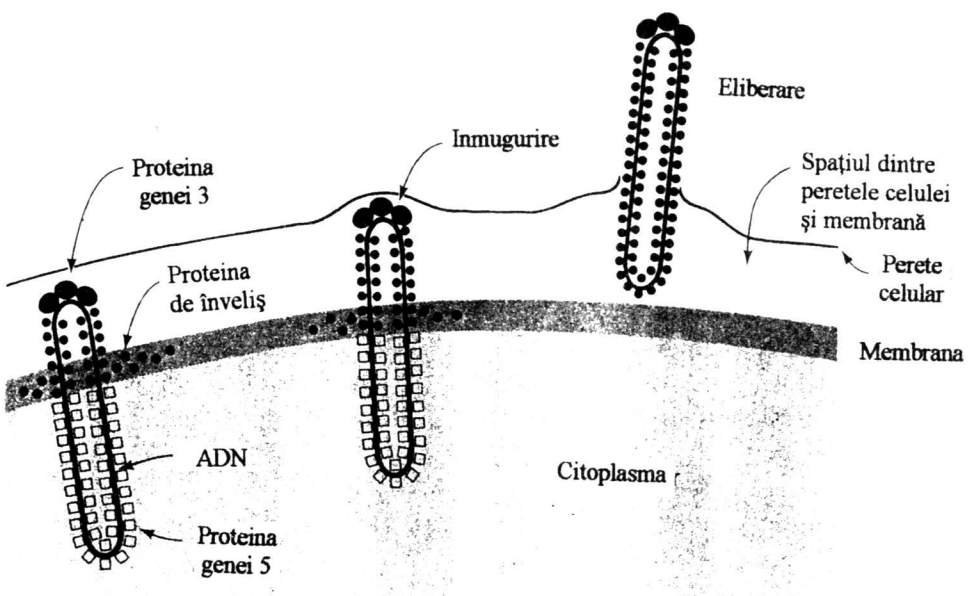


Fig. 180. Asamblarea şi eliberarea fagului M_{13}. Proteina genei 5 se asociază cu ADN genomic şi permite contactul complexului cu moleculele proteinei de înveliş, integrate în membrana citoplasmatică. Proteina de înveliş deplasează proteina gazdă 5. Proteina genei 3 este ataşată la o extremitate a particulei, având rol atât în eliberarea fagului progen, cât şi în procesul adsorbţiei (după Freifelder, 1977).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fagii icozaedrici cu genom ADN monocatenar au dimensiuni mici (25-35 nm). Prototipul lor este fagul ϕ X 174. Capsida este alcătuită din trei tipuri de proteine (F, G, H). Proteinele G şi H se termină cu prelungiri în formă de spiculi, necesară ataşării pe suprafaţa celulei.

In celula infectată, ADN se tapetează cu proteina SSB (*S*ingle *S*tranded *B*inding) şi începe să se replice. Iniţial, se sintetizează o moleculă de ARN scurtă, catalizată de ARN-polimeraza celulară, cu rol de primer. Complexul celular de replicare extinde primerul, iar ulterior ARN este digerat. Rezultă o moleculă ADN dublu catenară, care este forma replicativă.

Fagii filamentoşi (prototipul este fagul fd) au ca genom o moleculă de ADN circulară, care se dublează, prin pliere faţă de sine însăşi. Bazele nu sunt complementare, ceea ce înseamnă că ADN este monocatenar.

Virionul se adsoarbe la extremitatea unui pil F. Mecanismul pătrunderii ADN în celulă nu se cunoaşte. ADN monocatenar este tapetat cu o proteină codificată de fag, cu rol major, se pare, în împachetare şi nu în replicare. Impachetarea genomului în capsidă, este concomitentă cu ieşirea virionului. Proteina majoră a capsidei helicale este inclusă în membrana celulară. Pe măsură ce ADN fagic pătrunde în membrană, este acoperit de proteina capsidei. Virionii sunt eliberaţi fără pierderea viabilităţii celulei. Ea creşte, se divide şi eliberează fagi progeni. Sunt singurii fagi care nu necesită liza celulei pentru eliberare.

Fagii ARN "masculi" (prototipul este MS_2) au simetrie icozaedrică. Genomul este o moleculă de ARN monocatenar, de 4 kb lungime şi conţine 3-4 gene. Receptorii se găsesc pe suprafaţa pilului F şi de aceea infectează numai celulele bacteriene F^+, cu potenţialitate de donor dc material genetic în cuplul de conjugare. De aici derivă denumirea de fagi "masculi". Cele 4 gene codifică o *proteină capsidală* (C), o *ARN-polimerază* dependentă de ARN (P), o *lizina* (L) şi *proteina A*, reglatoare a asamblării, prezentă într-o singură copie în virion.

Toate copiile de ARN sunt identice, fie că au rol de genom, fie că sunt mesagere.

Importanţa fenomenului de bacteriofagie

Bacteriofagii sunt foarte răspândiţi în natură: se găsesc peste tot în mediile naturale în care trăiesc bacteriile sensibile care le pot fi gazdă, adică în apă, sol, în tractul digestiv al omului şi animalelor. Datorită efectului litic al interacţiunii cuplului, fagii reglează densitatea populaţiilor bacteriene în mediile naturale. Interacţiunea litică a cuplului fag-bacterie are câteva aplicaţii practice majore.

Fagul este utilizat în terapeutică, pentru tratamentul unor infecţii rezistente la antibiotice şi la agenţii chimioterapeutici.

Specificitatea relaţiei fag-bacterie, a stat la baza elaborării unui procedeu de identificare şi clasificare a bacteriilor, în funcţie de sensibilitatea lor la un fag sau la un grup de fagi, procedeu denumit *lizotipie* sau *tipizare prin fag*. Metoda este folosită pentru stabilirea diagnosticului bacteriologic în clinică, dar şi în studiile de sistematică bacteriană.

Prin tipizare fagică se înţelege identificarea unei tulpini bacteriene, utilizând un set de preparate fagice purificate şi standardizate, cărora li se cunoaşte capacitatea de a liza anumite tulpini bacteriene. Tipizarea prin fag este o metodă foarte utilă în studiile de *epidemiologie*, pentru a reconstitui originea şi circulaţia unei infecţii într-o colectivitate, în cursul unei epidemii. Practic, toate tulpinile unei specii bacteriene patogene, izolate în cursul unei epidemii de la bolnavi, de la purtători, din alimente contaminate, din vectori sau de animalele care acţionează ca izvor de infecţie, având origine comună, aparţin aceluiaşi lizotip (aceluiaşi tip fagic).

Metoda se foloseşte pentru identificarea tulpinilor de *Salmonella, Vibrio* etc. In acest scop, tulpinile se însămânţează în plăci, după tehnica "în pânză". Se testează sensibilitatea lor faţă de un număr cât mai mare de preparate fagice standardizate.

In bioindustrie, fagii pot produce liza microorganismelor producătoare de substanţe utile, provocând pierderi economice importante.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ciclul lizogen

Ciclul infecţios lizogen este cunoscut, în primul rând, pentru cuplul reprezentat de fagul λ şi celulele de *E. coli*.

Fagul λ se deosebeşte de fagii din seria T (par şi impar), atât din punct de vedere morfologic, cât şi al interacţiunii sale cu celulele sensibile. Capul este un icozaedru aproape perfect, cu diametruil de 55 nm, iar coada este mai lungă (155 nm), mai subţire şi mai flexibilă şi se îngustează progresiv spre extremitatea sa liberă. Este goală în interior, necontractilă, formată din 35 de discuri suprapuse.

Genomul fagic este o moleculă de ADN dublu catenară, lineară şi se termină cu porţiuni monocatenare, care conţin secvenţe de baze complementare, astfel încât în interiorul celulei bacteriene, se transformă într-o moleculă dublu catenară, circulară închisă covalent. Extremităţile complementare ale moleculei genomice se numesc *adezive* sau *coezive*. Reunirea lor pe baza complementarităţii bazelor, este condiţionată de activitatea polinucleotid-ligazei, care repară breşele existente.

Genomul fagului λ cuprinde circa 50 de gene. Cele din jumătatea stângă (a moleculei lineare) codifică proteine cu rol morfogenetic, iar cele din jumătatea dreaptă codifică factorii de interacţiune ai genomului fagic cu cromosomul bacterian, fiind importante în evoluţia lizogenă a cuplului fag-bacterie.

Corespunzător celor două programe genetice, cuplul *fag λ- E. coli* are două căi posibile de evoluţie :

- *calea litică*, ce implică sinteza proteinelor virale şi morfogeneza fagului, urmată de liza celulei bacteriene;
- *calea lizogenă*, în cursul căreia, replicarea genomului fagic este stopată. Genomul fagic se circularizează prin legarea capetelor sale adezive şi se integrează ca *profag* în cromosomul bacterian.

Fagii care după infecţie nu lizează celula se numesc *temperaţi*, iar o celulă bacteriană care conţine un set de gene fagice se numeşte *lizogenă*. ADN fagic se găseşte fie integrat în cromosomul bacterian, fie în stare autonomă (fizic independentă).

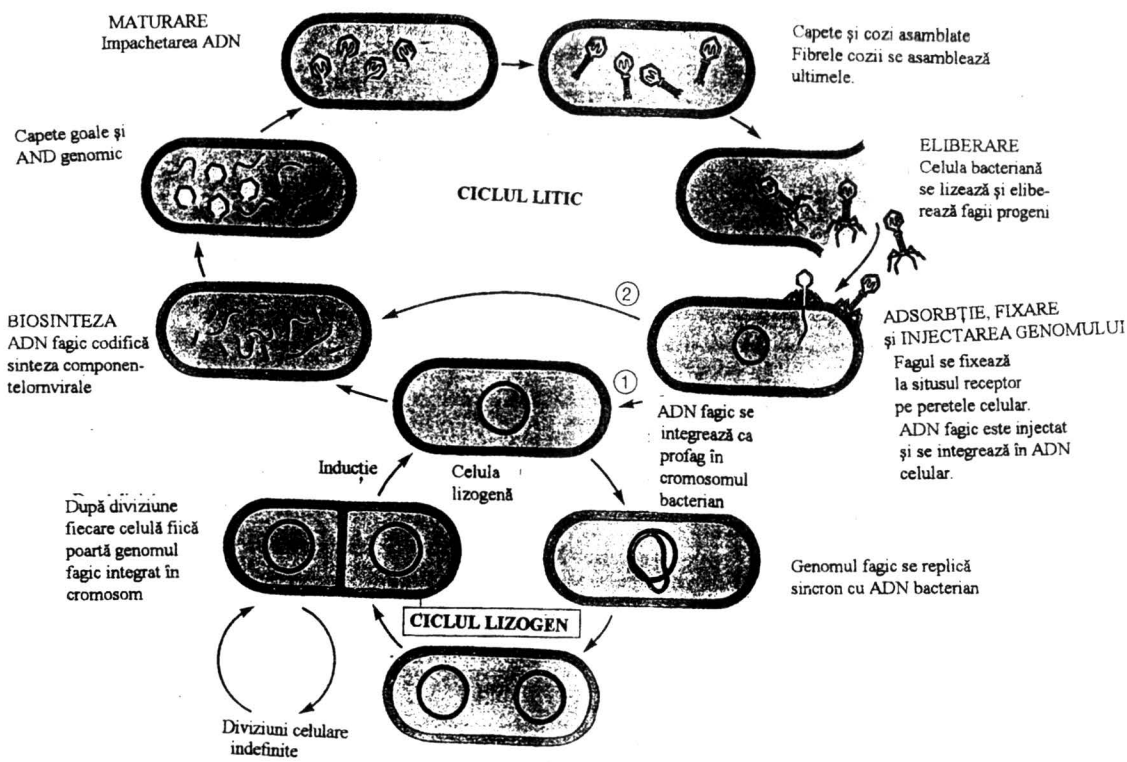


Fig. 181. După infecţie, cuplul E. coli-fag λ poate evolua litic sau lizogen.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dintre celulele infectate de fagii temperaţi, numai o proporţie mică evoluează lizogen, marea majoritate fiind lizate.

Fagul λ virulent, inoculat pe o pânză de celule bacteriene sensibile formează o plajă de liză clară, deoarece toate celulele sunt lizate. Fagul lambda temperat formează o plajă de liză cu o zonă centrală turbidă (opalescentă). Turbiditatea este determinată de multiplicarea bacteriilor lizogene, imune faţă de fag.

Decizia între liza şi lizogenie este dată de un mecanism reglator, complex şi subtil, influenţat de structura genetică a fagului, a celulei şi de factorii de mediu: concentraţia nutrienţilor în mediu şi multiplicitatea de infecţie. La o multiplicitate scăzută de infecţie se desfăşoară preponderent ciclul litic. Dar după câteva cicluri litice, multiplicitatea de infecţie devine înaltă şi un număr mic de celule sunt lizogenizate.

Odată cu epuizarea nutrienţilor din mediul agarizat, celulele bacteriene de la periferia plajei încetează să se dividă şi plaja încetează să se extindă. Deoarece în aria plajei, nutrienţii sunt încă disponibili, datorită lizei timpurii a majorităţii celulelor, celulele lizogene continuă să crească şi să se dividă, rezultând un centru turbid.

Oricare ar fi ponderea acestor factori, lizogenia este consecinţa blocării transcrierii şi traducerii informaţiei genetice a fagului, a blocării ciclului său de multiplicare, urmată de integrarea genomului ca profag, în cromosomul bacterian.

Integrarea genomului fagului lambda în cromosomul bacterian este rezultatul recombinării între *situsurile specifice de legare att (attchment*, englez = ataşare), situate pe cromosomul bacterian şi pe cel fagic. Ele condiţionează afinitatea de legare a celor două genomuri.

Situsurile *att* bacterian şi fagic au secvenţe omologe de baze şi sunt alcătuite din două jumătăţi situate simetric faţă de o regiune mediană *O*, de circa 15 baze, în care omologia celor două genomuri este totală. Situsul fagic de legare are o secvenţă de 317 baze şi este notat POP' (*P*hage), iar cel al cromosomului bacterian are o secvenţă de 250 de baze şi este notat cu BOB' (*B*acterium). Localizarea sa a fost identificată între gena *gal* (codifică enzimele metabolizării galactozei) şi gena *bio* (codifică sinteza biotinei). Recunoaşterea celor două genomuri se face prin intermediul regiunii *O*, la care participă secvenţele PP' şi BB'.

Esenţa mecanismului de integrare este *circularizarea* cromosomului fagic. Pentru ca integrarea genomului fagic să aibă loc, cele două genomuri sunt secţionate la nivelul situsului de legare, sub acţiunea unei *endonucleaze* (o nicază). O proteină codificată de fag – integraza – recunoaşte situsurile de legare a ADN fagic şi ADN bacterian şi catalizează legarea recombinatorie a celor două molecule.

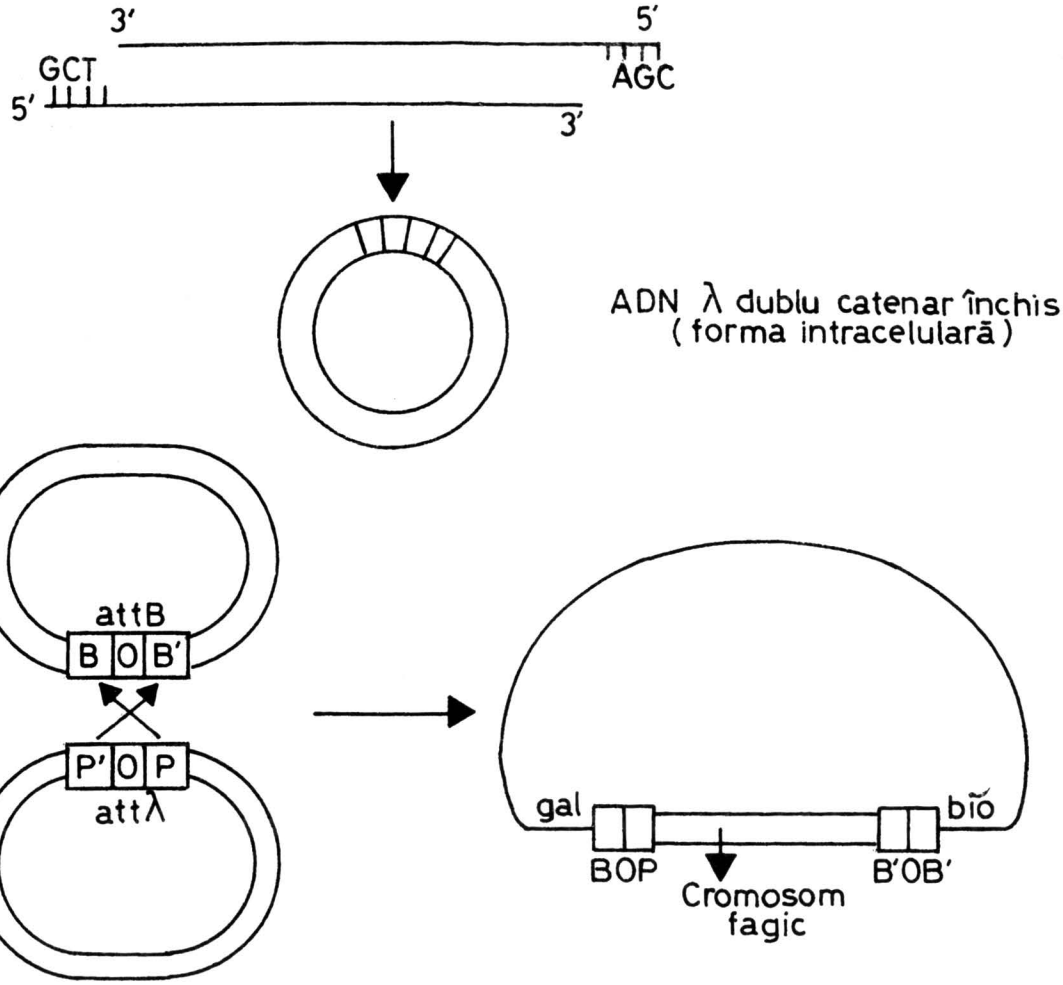
În procesul de integrare, zona centrală de omologie este cea care determină şi condiţionează integrarea, iar zonele laterale au un rol secundar în procesul de legare recombinatorie a celor două genomuri. Ca o consecinţă a circularizării şi integrării, ordinea lineară a genelor în molecula de ADN fagic este permutată. Apar două noi situsuri de legare: BOP' şi POB'.

Integraza este o topoizomeraza I. Enzima catalizează clivarea unei catene a dublului helix, roteşte un capăt al catenei clivate în jurul catenei întregi, secţionează şi cea de a II-a catenă şi apoi reuneşte extremităţile libere, astfel încât, catenele secţionate ale celor doi cromosomi, sunt aşezate într-o continuitate perfectă.

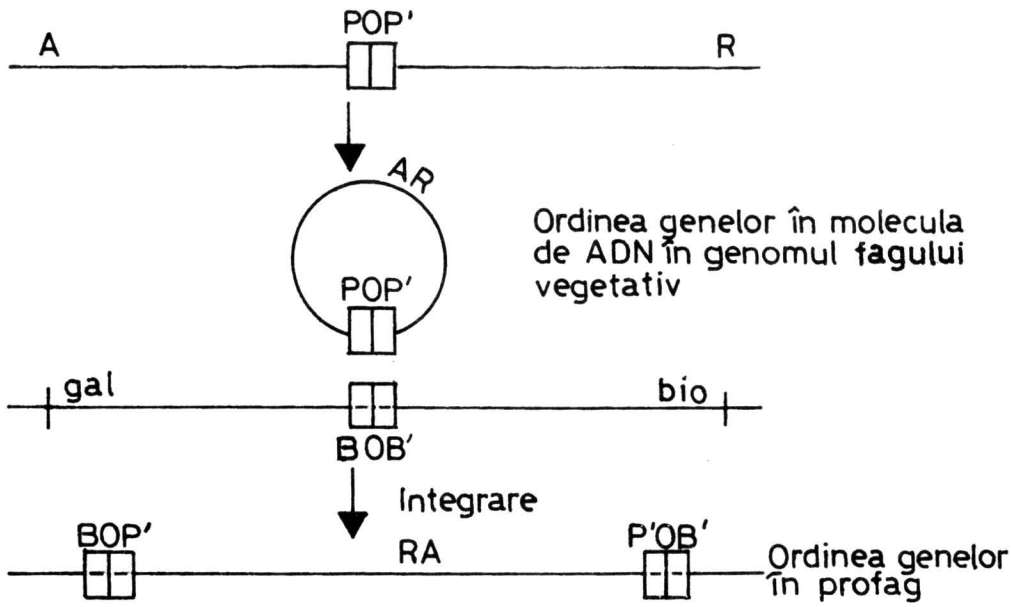
La sfârşitul procesului de integrare, cromosomul bacterian este mai lung cu echivalentul unui genom fagic, fapt demonstrat prin conjugare, prin măsurarea intervalului de timp necesar transferului celor două gene (*gal* şi *bio*) care este corespunzător mai mare.

Integrarea fagului λ în cromosomul bacterian corespunde unui proces unic, denumit *recombinare integrativă sau recombinare la situsuri specifice*. Omologia dintre situsurile de legare a celor două genomuri, nu este perfectă ca în recombinarea generală, dar procesul este rezultatul acţiunii unor enzime care recunosc anumite situsuri specifice şi secţionează decalat *secvenţe relativ omologe* ale celor două genomuri, generând extremităţi adezive, care permit legarea încrucişată şi integrarea genomului viral ca profag.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Integrarea cromosomului fagic cu cromosomul bacterian prin crossing over, la nivelul secvențelor specifice attP și attB



Modificarea ordinii genelor în profag, consecutivă procesului de integrare prin recombinare.

Fig. 182. Reprezentare schematică a etapelor procesului de integrare a cromosomului fagic λ în cromosomul bacterian.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După integrare, genele fagice se comportă ca şi genele cromosomale: se replică sincron cu cromosomul bacterian şi se transmit prin diviziune celulară, generaţiilor succesive, ca şi genele cromosomale.

Starea lizogenă este controlată de *represorul λ*, o proteină de 200 aminoacizi, codificată de profag, care se leagă de regiunea operator a genomului fagic integrat. Astfel, represorul fagic, intră în competiţie cu ARN-polimeraza, care, pentru iniţierea transcrierii se leagă de acelaşi situs al profagului. Legarea promptă a represorului λ de situsul de legare a operonilor virali are ca efect blocarea transcrierii tuturor genelor fagice, cu excepţia celor care codifică sinteza represorului.

Reglarea interacţiunii fag λ – E. coli

În interacţiunea litică fag λ – *E. coli*, funcţiile virale sunt exprimate integral. Rezultatul este liza bacteriei şi eliberarea a circa 100 particule virale progene.

În interacţiunea lizogenă, ADN viral se inseră în cromosomul celulei la situs specific. În stare integrată, majoritatea funcţiilor genomului fagic sunt stopate. Profagul se replică sincron cu cromosomul bacterian, pe parcursul multor generaţii celulare.

În stare lizogenă, funcţiile litice ale fagului sunt represate.

Expresia genelor fagului λ în ciclul litic. Genele virale sunt transcrise secvenţial. Proteinele necesare pentru procesul replicării şi recombinarii ADN fagic se sintetizează primele. Urmează sinteza proteinelor capului şi cozii, iar în final, a proteinelor necesare lizei celulei bacteriene.

Succesiunea în timp a exprimării genelor virale este esenţială, deoarece liza prematură a celulei bacteriene ar fi dezavantajoasă pentru virus.

În ciclul litic, genele se exprimă în trei etape: timpurie, intermediară şi tardivă.

În stadiul timpuriu, sinteza ARN începe la două situsuri promotoare, P_L (*L*eft) şi P_R (*R*ight). Copia iniţiată la situsul P_L, este mesajul pentru proteina *N*, care are un rol reglator foarte important. Ea permite transcrierea şi exprimarea celorlalte gene ale fagului lambda.

Proteina *Q* are un rol reglator esenţial pentru exprimarea genelor în programul tardiv (sinteza proteinelor capului, cozii şi a celor care lizează peretele celular).

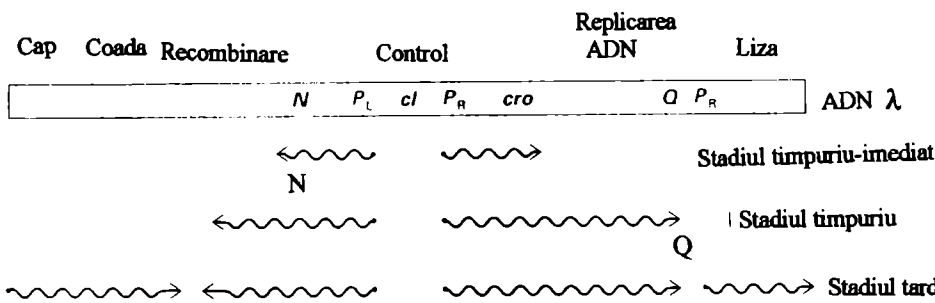


Fig. 183. Trei stadii ale transcrierii genelor în ciclul litic al fagului l. Proteina N, sintetizată în stadiul timpuriu activează genele transcrise în stadiul intermediar. Proteina Q sintetizată în stadiul intermediar activează genele stadiului tardiv (după H. Echols, 1979).

Controlul genic al interacţiunii lizogene

Ciclul lizogenic necesită integrarea, menţinerea şi eliberarea profagului. Starea de profag a genomului λ, necesită integrarea ADN viral în ADN bacterian şi inactivarea funcţiilor litice ale provirusului. Integrarea şi inactivarea genelor fagice sunt procese complexe, dar menţinerea stării de profag este relativ simplă. Singura genă exprimată a genomului fagic integrat, este gena *cI*. Ea codifică represorul λ, care se leagă de două regiuni operatoare, O_L şi O_R. Legarea represorului λ de O_L, stopează transcrierea genelor timpurii localizate spre stânga. Nu se sintetizează proteina *N* şi astfel calea litică se blochează.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Legarea represorului de O_R blochează exprimarea genelor spre dreapta, *cro* şi *Q*. Legarea represorului de O_L şi O_R represează întregul genom λ, cu excepţia genei *cI*, cea care codifică represorul.

Represorul λ este o proteină dimerică, formată din două subunităţi identice de 26 kD. Fiecare lanţ conţine un domeniu N-terminal, prin care se asociază cu ADN şi un domeniu C-terminal, ce interacţionează cu domeniul omolog al catenei pereche şi are rolul de a menţine dimerul.

Represorul λ recunoaşte două regiuni operatoare, O_L şi O_R. Fiecare operator conţine trei situsuri de legare pentru represorul λ. Studiile de digestie menajată cu nuclează au arătat ca situsurile de legare conţin 17 perechi de baze şi sunt separate prin secvenţe bogate în AT, lungi de 3-7 perechi de baze. Secvenţele de baze ale situsurilor operatoare sunt asemănătoare, dar nu identice, ceea ce explică afinităţile lor diferite pentru represorul λ.

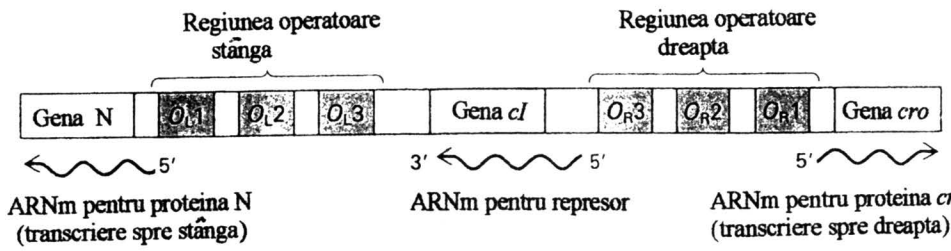


Fig. 184. Diagrama regiunilor operatoare O_L şi O_R şi a genelor adiacente. Gena cI codifică represorul. Subunităţile O_L1 şi O_R1 ale regiunilor operatoare au afinitatea cea mai înaltă pentru represor. Transcrierea spre stânga începe cu gena N, iar transcrierea spre dreapta începe cu gena *cro* (după Stryer, 1995).

Represorul λ îşi reglează propria sinteză. Numărul de molecule de represor λ într-o celulă lizogenizată de *E. coli*, este reglat cu precizie. O cantitate prea mică de represor semnifică intrarea în ciclul litic. O cantitate prea mare de represor ar face ca mediul celular să devină neadecvat pentru fag. De aceea, sinteza represorului este reglată cantitativ. Afinitatea diferită a regiunilor operatoare O_R1, O_R2 şi O_R3 pentru represor este cheia procesului de autoreglare. O_R1 are cea mai mare afinitate pentru represor. Legarea represorului de O_R2 amplifică transcrierea genei *cI*. Odată cu creşterea concentraţiei de represor, regiunea operatoare O_R3 leagă represorul şi astfel este blocată transcrierea genei *cI*.

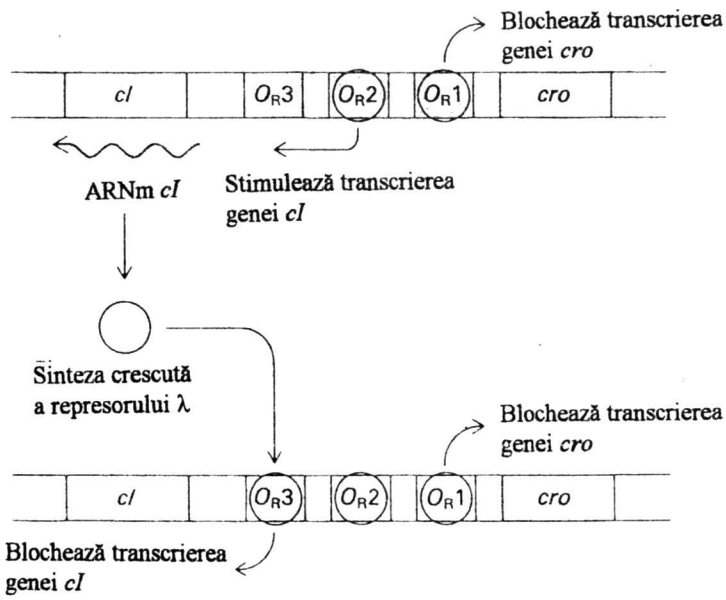


Fig. 185. Autoreglarea nivelului represorului λ. Când concentraţia sa e mică, represorul λ se leagă de O_R1, iar când scade şi mai mult se leagă de O_R2. Ocuparea subunităţii O_R2 stimulează transcrierea genei cI. Pe măsură ce concentraţia sa creşte, represorul se leagă şi de O_R3, iar transcrierea genei cI este inhibată (după Stryer, 1995).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Starea lizogenă se încheie odată cu proteoliza represorului λ şi cu sinteza proteinei *cro*. Scăderea numărului de molecule ale represorului λ permite transcrierea genei *cro*. Proteina *cro* (un dimer cu subunităţi de 7 kD) se leagă de O_R3 şi blochează transcrierea genei *cI*.

O_R3 are afinitate mai mare pentru proteina *cro* decât O_R1. Nivelul scăzut al proteinei *cro* represează complet sinteza represorului λ, fără să stopeze sinteza ei însăşi.

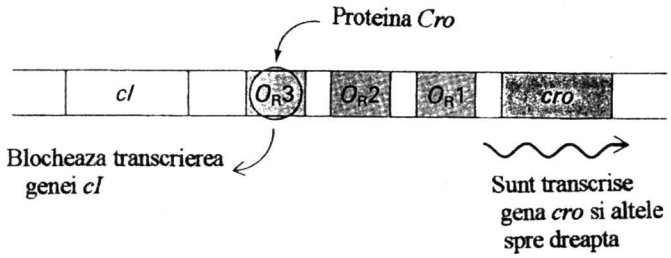


Fig. 186. La nivel scăzut, proteina Cro se leagă de O_R3 şi blochează transcrierea genei cI. Subunitatea O_R1 a regiunii O_R este liberă şi gena cro este transcrisă. Ciclul litic este astfel iniţiat.

Trecerea de la starea lizogenă, la cea de liză este indusă de avaria ADN, produsă de razele UV sau de agenţi chimici. Momentul esenţial al inducţiei litice este *proteoliza represorului lambda*. Agenţii fizici şi chimici care produc avarii ale moleculei de ADN generează regiuni monocatenare. ADN monocatenar, asociat cu proteina Rec A activează o protează latentă a represorului lambda. Odată cu proteoliza represorului se eliberează O_R1 şi este transcrisă gena *cro*, precum şi genele din partea dreaptă a regiunii operator.

Proprietăţile bacteriilor lizogene

Bacteriile lizogene dobândesc proprietăţi noi, care derivă din însăşi existenţa profagului în stare integrată: *imunitatea şi inducţia litică.*

1. *Imunitatea*. Bacteriile lizogene sunt imune la suprainfecţia cu un fag omolog (identic). Chiar dacă genomul fagic este injectat în citoplasma sa, evoluţia spre liză este stopată, deoarece represorul deja existent în celula lizogenă va represa exprimarea funcţiilor genomice ale virusului suprainfectant. Prin urmare, suprainfecţia unei celule lizogene cu un fag identic este *abortivă*. Fagul nu se multiplică şi genomul său se diluează în populaţia bacteriană rezultată prin diviziunea succesivă a generaţiilor de celule lizogene.

Imunitatea faţă de fagul suprainfectant este determinată de represor şi, ca urmare, evoluţia oricărui fag suprainfectant, depinde de sensibilitatea lui faţă de represorul rezident în celula lizogenă: dacă este sensibil, infecţia este abortivă, iar dacă este rezistent, infecţia evoluează spre liză. Dacă doi fagi manifestă sensibilitate faţă de acelaşi represor, se numesc fagi *coimuni*. Imunitatea bacteriană, datorată represiei specifice a genelor fagice, prin intermediul proteinei represor, trebuie deosebită de rezistenţa bacteriană la infecţie, controlată genetic, fiind datorată absenţei receptorilor pentru fag, sau pierderii capacităţii de a face sinteza acestora, ceea ce transformă bacteriile sensibile în bacterii rezistente.

2. *Inducţia litică*. Bacteriile lizogene au, potenţial, capacitatea de evoluţie litică, denumită încă şi inducţie litică. Ele se pot liza "spontan", fără intervenţia unui fag suprainfectant de la exterior. In mod obişnuit, fenomenul inducţiei litice se produce cu o frecvenţă mică ($1/10^2 - 10^7$ celule), sau cu o frecvenţă mult mai mare după expunerea bacteriilor lizogene "inductibile", la acţiunea unor agenţi inductori: radiatiile UV sau X, peroxizi, azotiperita, agenţi alchilanţi. Sub acţiunea lor, majoritatea celulelor mor, iar cele care supravieţuiesc suferă fenomenul de "inducţie", adică de trecere din starea lizogenă spre ciclul litic. Agenţii inductori, probabil inhibă sinteza represorului. Profagul ieşit de sub acţiunea inhibitorie a represorului se excizează din cromosomul bacterian şi trece în stare liberă (vegetativă), evoluând spre liză, cu eliberare de particule fagice progene. In mod normal, excizia ADN viral se face cu exactitate la nivelul situsurilor sale de integrare ca profag (*att P* şi *att B*), iar fagii eliberaţi sunt identici din punct de vedere genetic, cu fagul infectant originar.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cu o frecvenţă mică ($1/10^5 - 10^6$ celule), excizia genomului fagic se face la nivelul altor situsuri ale cromosomului bacterian. Rezultă astfel, o moleculă de ADN circulară, care conţine o mică secvenţă a ADN bacterian, adiacentă situsului de inserţie a profagului (în acest caz, genele *gal* sau *bio*), din care lipseşte o secvenţă echivalentă de ADN fagic, situată la capătul opus al profagului. Genomul fagic, purtător al unei secvenţe a cromosomului bacterian este încorporat în fagii maturi. Astfel de particule fagice sunt transductoare. Intr-un nou ciclu infecţios, fagii transductori aduc în celula bacteriană, atât genomul viral, cât şi secvenţele de ADN bacterian pe care le transduc.

Mecanisme celulare de apărare antifagică. Bacteriile şi-au elaborat mecanisme de rezistenţă faţă de infecţia fagică, iar la rândul lor, fagii au elaborat strategii de contracarare, ceea ce reflectă importanţa majoră pe care o are infecţia fagică în mediile naturale.

Mecanismul major de apărare a celulei este reprezentat de sistemul enzimatic de *restricţie-modificare*. Enzimele de restricţie hidrolizează ADN exogen care n-a fost modificat chimic (în special prin metilare) la situsurile specifice. Enzimele de restricţie recunosc situsurile specifice ale ADN exogen, clivează molecula, iar exonucleazele nespecifice degradează fragmentele lineare rezultate.

ADN propriu este protejat de acţiunea enzimelor de restricţie prin modificare. ADN fagic care scapă acţiunii enzimelor de restricţie, este modificat şi fagul se replică. La ciclul infecţios următor, teoretic, toate celulele tulpinii bacteriene vor fi sensibile la infecţia fagică, deoarece ADN fagic este deja modificat. Replicarea virală este stopată, numai dacă diferitele tulpini bacteriene sensibile la un fag, au specificităţi diferite de restricţie. O tulpină cu o specificitate de restricţie rară, este rezistentă la marea majoritate a fagilor. Supravieţuirea ei este favorizată în raport cu tulpinile care au specificităţi comune de restricţie şi de aceea tinde să devină dominantă în mediu.

Fagii, la rândul lor, evită fenomenul restricţiei bacteriene pe diferite căi. Prima modalitae este frecvenţa mică a secvenţelor de recunoaştere. De exemplu, fagii de *Bacillus* au puţine palindroame de 4 baze, recunoscute de enzimele bacteriene de restricţie, iar colifagii au puţine palindroame de 6 baze, pe care le recunosc enzimele de *E. coli*.

Importanţa studiului cuplului lizogen E. coli-fag λ

Studiul cuplului fag-bacterie, dar în special studiul interacţiunii lizogene fag λ – *E. coli* (tulpina K_{12}) a avut un rol esenţial în fundamentarea domeniului biologiei moleculare. Studiul aceluiaşi model a furnizat o explicaţie logică cu privire la mecanismul apariţiei cancerului viral. In 1952, A. Lwoff a emis ipoteza, demonstrată ulterior, că virusurile oncogene îşi datorează acţiunea cancerigenă, proprietăţii lor de a se integra ca *provirus* în genomul celulei gazdă.

Fagul este un factor care influenţează semnificativ variabilitatea şi evoluţia populaţiilor bacteriene în mediile naturale, deoarece o anumită categorie de fagi poate să asigure transferul materialului genetic de la o celulă la altă, prin mecanismul transducţiei genetice.

În natură, fagii se menţin şi se propagă sub formă de profagi în celulele lizogene. În stare liberă, fagii îşi păstrează infecţiozitatea un interval foarte scurt. Şansa adsorbţiei lor pe o celulă bacteriană sensibilă şi iniţierea unui nou ciclu de multiplicare este foarte mică. În absenţa acesteia, fagii se adsorb pe substanţe organice, pe diverse particule coloidale, pe resturi de celule bacteriene. Din această cauză, modalitatea lor principală de propagare în mediile naturale, este cea de genom integrat (profag) în cromosomul bacterian.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ONCOGENEZA VIRALĂ

Orice hipertrofie localizată a unui ţesut, poartă denumirea de *tumoră*. Ea poate fi determinată de o proliferare celulară sau de inflamaţie. O tumoră determinată de proliferare celulară se numeste *neoplasm* (creştere nouă). Neoplasmele neinvazive rămân localizate la locul formării şi se numesc *benigne*. Cele care invadează ţesuturile învecinate şi se diseminează la distanţă, se numesc neoplasme *maligne*.

Tumorile care îşi au originea în celulele epiteliale sunt incluse în categoria *carcinoamelor*, iar cele originare în celulele mezenhimale se numesc *sarcoame*.

Evenimentul primordial al maladiei este procesul biologic al *transformării maligne a celulei*. Cauzele care determină transformarea malignă, sunt multiple şi incriminarea uneia sau alteia este însoţită de numeroase incertitudini. Maladia neoplazică nu este unică, ci, prin diversitatea substratului celular de origine, a factorilor transformanţi, a stadiului fiziologic al celulei în momentul transformării maligne, include un număr nelimitat de maladii.

Transformarea malignă este rezultatul acţiunii convergente a numeroşi factori de mediu extern şi intern, care interacţionează şi se influenţează reciproc:

- factori umorali (în special hormoni din sfera genitală);
- substanţe chimice de origine industrială (inclusiv numeroase substanţe de uz farmaceutic);
- substanţe alimentare modificate chimic prin prelucrare neadecvată;
- factori fizici (radiaţii ultraviolete (UV), radiaţii ionizante, traumatisme);
- factori biologici (virusuri).

Evenimentul declanşator al malignizării celulare este *mutaţia somatică*. Celulele somatice sunt cele ce nu sunt destinate să devină celule sexuale. Un argument indirect al rolului mutaţiilor este creşterea incidenţei tumorilor, odată cu vârsta, fapt explicabil prin necesitatea acumulării mutaţiilor somatice, înainte de producerea malignizării.

Factorii interni sau externi care produc mutaţii şi favorizează transformarea malignă a celulelor poartă denumirea de *carcinogeni*.

Dintre factorii fizici, radiaţiile UV şi cele ionizante sunt foarte mutagene. Expunerea tegumentului la lumina UV, cauzează producerea cancerului tegumentar, iar razele X aplicate la nivelul tiroidei produc cancer tiroidian. Majoritatea celulelor expuse acţiunii agenţilor mutageni, suferă leziuni incompatibile cu supravieţuirea, dar un număr foarte mic dintre ele se malignizează.

In concepţia modernă, carcinogenii chimici au rolul de *iniţiatori* ai malignizării. Efectul lor este desăvârşit de alţi agenţi chimici, denumiţi *promotori*. Iniţiatorii sunt carcinogeni care acţionează prin efectul lor mutagen, dar singuri nu produc malignizarea, deoarece mecanismele de reparare a ADN sunt eficiente (acţionează rapid şi fără erori). Promotorii nu sunt mutageni, dar mimează efectele factorilor de creştere, deoarece stimulează diviziunea celulară şi expresia alterată a genelor.

Virusurile oncogene (tumorigene) sunt potenţial inductoare ale transformării maligne, *in vivo* sau *in vitro*. Pentru unele, potenţialul transformant a fost demonstrat numai *in vitro*.

Ipoteza originii virale (infecţioase) a cancerului este veche. În 1903, Metchnikoff şi Borell au presupus ca tumorile maligne s-ar putea datora infecţiei cu agenţi patogeni. In 1908, Ellerman şi Bang au arătat că leucoza găinilor poate fi transmisă de la organismele bolnave, la cele sănătoase, prin filtratul acelular al sângelui. În 1911, P. Rous a adus dovada experimentală, că sarcomul muşchiului pectoral al găinii (o tumoră solidă) este produs de un agent filtrant. Descoperirea sa a fost prea timpurie faţă de nivelul general al cunoaşterii şi nu s-a impus atenţiei. Cercetările au fost abandonate, dar pentru valoarea deosebită a rezultatelor investigaţiilor, lui P. Rous i s-a decernat, postmortem, premiul Nobel (1966).

Unul din factorii majori ai neîncrederii în originea posibil infecţioasă a cancerului provenea din faptul că tumorile nu se transmit de la organismul bolnav la cel sănătos. Tumorile organismelor animale şi umane nu sunt infecţioase în crescătorii sau în spitale. Observaţiile clinice sugerau că tumorile apar din alte cauze decât cele infecţioase, rolul factorilor chimici fiind preponderent:

- la şoarece, badijonarea regională a tegumentului cu gudroane, provoacă o iritare cronică şi apariţia, în timp, a tumorilor maligne;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- existența cancerelor profesionale: tumori tegumentare la personalul unităților radioactive, expus iradierilor accidentale, cancerul scrotal la coșari;

- cancerul pulmonar la fumători (componetele cancerigene sunt gudroanele rezultate din arderea tutunului și a foiței). În zonele geografice unde tutunul se mestecă, tumorile sunt localizate pe limbă sau pe mucoasa bucală.

Problema originii infecțioase a unor tumori a fost reluată de către L. Gross (1952), care a descoperit virusul leucemiei șoarecelui. S-a considerat că șoarecele este un organism oarecum "artificial", datorită gradului înalt de consanguinizare. În 1964, s-a evidențiat pentru prima dată, cu certitudine, natura virală a unei tumori umane: virusul Epstein-Barr este agentul declanșator al proliferării celulare ce produce *limfomul Burkitt* (o tumoră a regiunii maxilare, la copiii între 4 și 15 ani), cu originea în limfocitele B.

Cercetările ulterioare, pe sisteme celulare *in vitro*, au scos în evidență că un număr mare de virusuri, în special cu genom ADN au capacitatea de a induce transformarea malignă a celulelor.

În regnul vegetal, există o dovadă certă a originii infecțioase a proliferării celulare necontrolate: tumorile de colet (crown gall) sunt produse de *Agrobacterium tumefaciens*, o bacterie heterotrofă din sol. Proliferarea celulară necontrolată, este rezultatul transferului plasmidei *Ti* (*T*umor *i*nducing), în celulele plantei.

Caracterele generale ale celulelor normale

Celulele normale au o durată de viață, limitată în timp. Atât *in vivo*, cât și *in vitro*, ele realizează un număr limitat de cicluri de diviziune.

Diviziunea celulelor normale *in vitro* este strict dependentă de următoarele condiții:

- densitatea celulară
- disponibilitatea factorilor de creștere
- disponibilitatea unei suprafețe solide la care să adere.

Dependența creșterii de densitatea celulară, se manifestă prin fenomenul *inhibiției de contact*.

Inhibiția de contact sau creșterea dependentă de densitate definește capacitatea celulei normale de a recepționa stimuli din mediul extern și de a înceta diviziunea și mișcările (formarea de pseudopode) în condiții restrictive de spațiu. Consecința creșterii dependente de densitate este că, *in vitro*, celulele normale se divid numai atâta timp cât dispun de spațiul necesar, adică cresc numai până la contactul cu celulele vecine, formând un monostrat. Când monostratul este confluent, diviziunea se oprește. *In vitro*, celulele normale realizează o *creștere bidimensională*, iar *in vivo*, consecința creșterii limitate de spațiu este păstrarea riguroasă a arhitecturii țesutului și organului din care fac parte

Inhibiția de contact este rezultatul unor mecanisme reglatoare complexe. Diviziunea celulelor normale, *in vivo* este coordonată de semnale multiple din mediul extracelular, recepționate de molecule membranare specializate funcțional, cunoscute sub denumirea generică de *integrine*, adică molecule care integrează activitatea unei celule în contextul ansamblului structural din care fac parte.

Denumirea de "integrină" s-a bazat pe concepția că aceste molecule au rolul unor punți de legătură între matricea extracelulară și citoschelet și mediază activitățile de răspuns ale celulei normale, în contextul conviețuirii ei cu celulele vecine.

Integrinele sunt proteine heterodimere transmembranare, cu un plan structural bine conservat. Subunitățile mari (alfa) conțin 3-4 secvențe repetitive, cu rolul de legare a cationilor și sunt alcătuite din trei domenii: extracelular, transmembranar și citoplasmatic. Subunitatea mică (beta) a fiecărei integrine, are numeroase resturi de cisteină și se asociază necovalent cu subunitatea mare.

Celulele normale sintetizează și secretă numeroase componente moleculare, care formează *matricea*, alcătuită din fibronectină, molecule de colagen etc.

Domeniul citoplasmatic al integrinelor se conectează cu *citoscheletul*, acesta la rândul lui fiind mediatorul interacțiunilor celulă-celulă și celulă-substrat.

Integrinele, prin domeniul lor extern leagă diferite molecule din mediul matriceal și extracelular și transmit semnale în interiorul celulei, pe care le preia citoscheletul, cel care condiționează comportamentul normal ("social") al celulei, care se materializează în fenomenul *inhibiției de contact*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

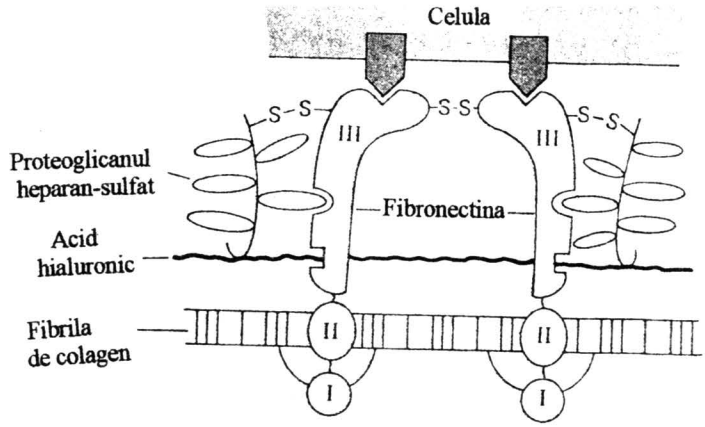


Fig. 187. Ilustrarea schematică a funcției fibronectinei. Ea leagă suprafața celulei de matricea extracelulară (colagen, acid hialuronic, heparan-sulfat, proteoglicani). Moleculele de fibronectină sunt dimeri reuniți prin punți S-S și sunt alcătuite din trei domenii, la nivelul cărora se găsesc situsuri de legare pentru diferiți liganzi (după Hynes, 1981).

Filamentele de actină ce formează citoscheletul celulei normale au o distribuție ordonată și se ancorează pe fața internă a membranei citoplasmatice. Filamentele citoscheletului preiau semnalele recepționate de integrinele membranare din mediul extern. In celula normală, filamentele de actină au o orientare bine definită, ceea ce determină o formă constantă și un anumit grad de rigiditate a acesteia.

Creșterea și diviziunea celulelor normale *in vitro* este restrictivă în raport cu doi factori:

Disponibilitatea factorilor de creștere. Celulele normale necesită concentrații mari de ser de origine animală, care trebuie adăugat la compoziția mediului nutritiv. Ea are o capacitate limitată de transport intracelular al moleculelor nutritive și realizează un metabolism aerob.

Disponibilitatea unei suprafețe solide. Dependența față de suportul de aderență pentru creșterea *in vitro* este o condiție absolută a celulelor normale (fibroblaste sau de tip epitelial). Dacă sunt menținute în suspensie, ele nu cresc, chiar într-un mediu care conține toți factorii de creștere. Rămân viabile un timp, dar nu cresc și nu se divid.

Din punct de vedere genetic, celula normală este diploidă.

Particularitatea fundamentală a celulelor normale, este diviziunea cu o rată proprie fiecărui țesut și păstrarea arhitecturii normale a acestora.

Particularitățile funcționale generale ale celulelor maligne

Transformarea malignă este un proces care se realizează în trepte și implică cel puțin două clase de funcții biologice. Prima este cea care determină *imortalizarea*, ceea ce semnifică stabilizarea celulelor *in vitro*, adică durata lor de viață este nelimitată.

A II-a clasă de funcții este cea care determină *transformarea malignă*, asociată cu modificări fenotipice și fiziologice.

Distincția dintre celulele normale și cele transformate malign se bazează pe un set de caractere care nu sunt totdeauna evidente și acceptate. Pentru scopuri practice, o celulă transformată, se definește prin caracterul *permanent* al creșterii sale, nelimitată în timp.

Celula malignă este o celulă "anarhică, asocială și antisocială", care nu recunoaște celulele vecine. Se divide în ritm propriu. Are aderență scăzută față de vecinele sale și din această cauză, are caracter *invaziv*, adică migrează la distanță printre celulele normale.

Celulele maligne continuă să se dividă în condițiile în care, celulele normale răspund prin încetarea creșterii și diviziunii, atât *in vivo* cât și *in vitro*.

Diferențele dintre celulele transformate malign și cele normale se pot împărți în 4 categorii:

1) modificări ale modului de creștere
2) modificări ale suprafeței celulare

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3) modificări ale componentelor intracelulare, ce rezultă din prezenţa genelor transformante
4)modificări fiziologice.

1) Modificările *modului creştere* includ:

a) creşterea la o densitate celulară superioară

b) necesarul redus de factori de creştere în mediu

c) diminuarea dependenţei de suportul de creştere

d) formarea tumorilor (tumorigeneza), după injectarea *in vivo*.

Densitatea celulară. Celulele maligne realizează, *in vitro*, densităţi mari pe unitatea de suprafaţă, de 5-10 ori mai mari decât celulele normale, deoarece, pierzându-şi inhibiţia de contact cresc în straturi suprapuse. Creşterea lor este aglomerată (tridimensională). Pe suprafaţa suportului solid, se formează aglomerări de celule, denumite *microtumori*, iar *in vivo*, pierderea inhibiţiei de contact se reflectă în caracterul invaziv al creşterii şi în modificarea arhitecturii normale a ţesutului.

Scăderea necesarului de factori de creştere. Celula malignă are necesităţi scăzute pentru factorii de creştere. Spre deosebire de celula normală, creşterea celulei maligne este relativ independentă de factorii serici stimulatori (hormoni, vitamine, ioni de Ca^{2+}). Celulele tumorale se divid cu o rată foarte înaltă, la concentraţii serice foarte puţin favorabile creşterii celulelor normale, deoarece mecanismele lor de transport membranar a nutrienţilor (glucoza, aminoacizi, etc.) sunt de 5-10 ori mai eficiente, comparativ cu ale celulelor normale, fiind active chiar la concenţratii foarte scăzute ale moleculelor nutritive.

Diminuarea dependenţei faţă de suportul de creştere in vitro. Celulele maligne pierd parţial sau total, dependenţa de suportul de creştere şi se divid în medii semisolide şi chiar lichide. Pierderea dependenţei de ancorare de suport este foarte evidentă, chiar *in vivo*, pentru tumorile lichide (ascite).

Independenţa de creştere faţă de suportul mecanic se corelează cu modificări ale citoscheletului: pierderea filamentelor de actină sau redistribuirea lor în celulă. In celula normală, filamentele de actină se inseră pe membrana plasmatică, la joncţiunea acesteia cu suportul de creştere. In celula malignă, filamentele de actină au o distribuţie difuză. Datorită dezorganizării reţelei de actină, celulele maligne sunt mai uşor deformabile.

Scăderea aderenţei faţă de suport şi faţă de celulele vecine, creşterea accentuată a mobilităţii, abolirea capacităţii de recunoaştere selectivă a semnalelor din mediul extern, se explică prin diminuarea cantitativă a integrinelor în membrana celulelor maligne. Datorită scăderii aderenţei, celula tumorală se desprinde din angrenajul ei structural şi migrează la distanţă, formând *metastaze*.

Acţiunea tumorigenă. Celulele maligne, după injectarea la organisme cu molecule de histocompatibilitate identice se divid şi produc tumori.

2) *Modificările suprafeţei celulare* includ:

- creşterea gradului de aglutinabilitate cu lectinele din plante;
- modificarea cantitativă a glicoproteinelor şi glicolipidelor
- creşterea ratei de transport a nutrienţilor
- creşterea ratei de secreţie a proteazelor sau de activatori ai proteazelor serice.

Celulele transformate malign pierd fibronectina, ceea ce explică scăderea aderenţei de suport şi creşterea mobilităţii. Pierderea fibronectinei este consecinţa nivelului său scăzut de sinteză, a secreţiei de proteaze, a turnover-ului ridicat sau a exprimării diminuate a receptorilor de fibronectină pe suprafaţa celulei.

Pe suprafaţa celulelor maligne se găseşte o cantitate crescută de *mucopolizaharide*, ce se evidenţiază cu coloraţii speciale.

Celula tumorală conţine pe suprafaţa sa, molecule glicoproteice noi (absente pe suprafaţa celulei normale), care se comportă ca *antigene*. Sinteza lor este determinată de starea transformată. Antigenele tumorale formează o adevărată reţea moleculară pericelulară.

3) *Schimbările componentelor intracelulare* includ:

- modificarea citoscheletului
- prezenţa ADN viral, a ARNm viral şi a proteinelor codificate de virus, în celulele malignizate după infecţia virală.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4) *Modificări fiziologice*:

- creşterea ratei sintezei macromoleculelor (ADN, ARN, proteine)
- creşterea ratei metabolice
- creşterea ratei de diviziune
- activarea sau supresia unor gene celulare specifice.

In celula malignă, sinteza ADN are loc cu o rată net superioară (de până la 10 ori mai mare), în raport cu celula normală. In unele cazuri, celulele transformate malign prezintă activităţi de tipul "uzurpărilor de identitate". S-au descris situaţii în care tumorile de origine pulmonară produc hormoni hipotalamici (vasopresina) sau hipofizari (hormon corticotrop), fapt explicabil prin derepresia unor gene nefuncţionale în celula normală de origine.

Celulele tumorale manifestă *efectul Crabtree* (fenomenul de inhibiţie a respiraţiei în prezenţa glucozei). Consecinţa este că celulele tumorale catabolizează glucoza pe cale predominant *anaerobă* (fermentativă). Celulele tumorale produc cantităţi mari de acid lactic, prin catabolismul anaerob al glucozei. Catena de respiraţie celulară, pierde într-o măsură semnificativă, citocromii *a, b* şi *c*, prin diminuarea sintezei lor. Astfel, activitatea ciclului Krebs diminuă până inhibiţia totală.

Deoarece mecanismele de transport membranar sunt foarte eficiente, celula tumorală se comportă ca o *capcană de substanţe nutritive*. Rata sa de creştere şi diviziune este net superioară faţă de a celulei normale de origine, ca o expresie a ratei metabolice foarte înalte.

Celulele maligne se caracterizează prin modificări *genetice*, ce se manifestă printr-o accentuată instabilitate a setului cromosomal. Sunt frecvente modificările numerice ale garniturii cromosomale (aneuploidie). Schimburile intercromosomale de fragmente sunt un marker distinctiv al celulelor maligne. Una din modificări este *translocaţia*, fenomen mutaţional prin care un fragment cromosomal de dimensiuni variate este transferat de pe un cromosom, pe altul neomolog. De exemplu, în leucemia mieloidă cronică, un fragment al unuia din cromosomii perechii 22 este translocat pe unul din cromosomii perechii 9. Cromosomul mai scurt al perechii 22 se numeşte *cromosom Philadelphia* şi este rezultatul unui proces de translocaţie nereciprocă. In celulele tumorale au loc, uneori, procese de translocaţie robertsoniană, prin care cei doi cromosomi telocentrici, fuzionează prin centromerii lor, rezultând un cromosom metacentric sau submetacentric.

Virusuri oncogene

Virusurile oncogene au proprietatea de a induce, în culturi celulare sau *in vivo*, transformarea malignă a celulelor pe care le infectează. Din cele peste 600 de virusuri, infecţioase pentru om şi animale, circa 150 sunt considerate *potenţial oncogene* şi sunt distribuite în următorele grupe:

- *Oncornavirusuri*, virusuri oncogene cu genom ARN din familia *Retraviridae*;
- *Oncodnavirusuri*, virusuri oncogene cu genom ADN, care aparţin următoarele familii:

Familia *Papovaviridae*, cu subfamiliile *Papillomavirinae* (g. *Papillomavirus)* şi *Polyomavirinae* (g. *Polyomavirus),* virusurile vacuolante *(SV_{40})*. Papilomavirusurile determină apariţia papiloamelor la numeroase specii: om, feline, bovine, iepure. Papiloamele au o evoluţie benignă, dar uneori poate progresa la un carcinom metastazant. Virusul polioma induce tumori la şoarece. SV_{40}, în condiţii naturale, infectează maimuţele (*M. rhesus, Cercopithecus, Cynomolgus).* Tumorile produse de *Polyoma* şi de virusurile vacuolante la puii de rozătoare sunt delimitate de o capsulă bine diferenţiată, necrozează extensiv în zona centrală şi nu metastazează.

Familia *Adenoviridae*. Opt din cele aproape 50 de serotipuri care infectează omul, produc sarcoame la hamsterul nou născut. Cele mai oncogene sunt serotipurile 12, 18 şi 31, iar serotipurile 3, 7, 14, 16 şi 21 au activitate oncogenă slabă. Potenţialul oncogen s-a evidenţiat la 6 serotipuri infecţioase pentru maimuţă, precum şi la altele izolate de la bovine, câine.

Familia *Herpesviridae*. La om *virusul Epstein-Barr* este agentul inductor al limfomului Burkitt. *Virusul Lucké* produce adenoame şi adenocarcinoame ale rinichiului broaştei leopard. La păsări, *virusul Marek* produce o neurofibromatoză, caracteristică prin proliferarea invazivă a limfocitelor T.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Familia *Hepadnaviridae. Hepadnavirus* (virusul hepatitei B) produce carcinomul hepatocelular.

Familia *Poxviridae. Moluscipoxvirus* produce proliferări celulare.

Pentru ca un virus să fie oncogen trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:

- informaţia genetică virală *să se replice în nucleul celulei* şi să aibă capacitatea de a se integra în nucleu. Aceasta permite genomului viral să persiste în genomul celulei şi să se tramsmită generaţiilor succesive de celule;

- să conţină *informaţie genetică transformantă*, care să inducă trecerea celulei de la starea normală la cea malignă, sau dacă nu conţine gene transformante, să interfere cu activitatea *oncogenelor celulare.*

Virusurile oncogene sunt potenţial carcinogene la animale, dar unele au capacitate transformantă numai a celulelor *in vitro*. Modificările de natură neoplazică a celulelor, *in vitro* apar la 12-48 de ore după infecţie.

Transformarea malignă este rezultatul acţiunii genelor *oncogene ale virusurilor cu genom ADN*, a *oncogenelor virusurilor cu genom ARN*, a *oncogenelor celulare* (protooncogene) şi a genelor supresoare ale oncogenelor celulare denumite *antioncogene*. Antioncogenele codifică proteine care inhibă creşterea şi multiplicarea celulară.

Pentru a-şi exercita efectul transformant, virusurile oncogene acţionează sinergic cu alţi factori de mediu sau cu factori genetici, denumiţi factori *cocarcinogeni.*

Trăsăturile generale ale transformării celulare sub acţiunea virusurilor oncogene sunt următoarele:

a) Transformarea este rezultatul infecţiei unei celule sensibile cu o singură particulă virală;

b) Transformarea este însoţită de persistenţa întregului genom viral sau numai a unei parţi a acestuia, integrate în ADN celular. Transformarea este consecinţa alterării genetice a celulei şi este ireversibilă;

c) Transformarea este însoţită de exprimarea continuă a unui număr limitat de gene virale. Uneori, o singură genă virală, este suficientă pentru a menţine starea transformată.

Studiul transformării maligne sub acţiunea virusurilor este important pentru descoperirea etiologiei virale a unor cancere, precum şi pentru evidenţierea protooncogenelor activate în cancere de etiologie nevirală.

Oncogenele celulare

Transformarea malignă indusă de virusurile oncogene ARN şi ADN presupune interacţiunea genomului viral cu o categorie specială de gene celulare normale, denumite *oncogene* sau cu produsele de sinteză a acestora - *oncoproteinele.* De aceea, considerăm că este necesară o succintă prezentare a lor.

Denumirea de "oncogene" semnifică faptul ca sunt gene potenţial capabile să determine transformarea malignă a celulei, sub acţiunea inductoare a unor factori de mediu.

Genele oncogene sunt componente ale setului normal de gene celulare şi se numesc *oncogene celulare (c-onc)* sau *protooncogene*. Unele (ras, jun) au o constanţă evolutivă remarcabilă, fiind prezente de la levuri până la om.

Oncogenele celulare, în condiţii normale îndeplinesc funcţii esenţiale pentru controlul *creşterii, diviziunii şi diferenţierii*, iar în condiţii de dezechilibru funcţional, oncogenele sunt efectorii transformării maligne.

Oncogenele celulare codifică sinteza *oncoproteinelor*, molecule cu funcţie esenţială în controlul diferenţierii celulelor în cursul dezvoltării embrionare, precum şi al creşterii şi diviziuni lor, pe toată durata vieţii. Unele codifică sinteza factorilor de creştere celulară (c-sis) sau a receptorilor membranari ai factorilor de creştere. Toate oncogenele îşi exercită funcţia prin oncoproteinele pe care le codifică. Nu există oncogene celulare care să aibă numai secvenţe reglatoare, necodificatoare. Oncoproteinele se definesc prin potenţialul lor de a induce transformarea malignă a celulei. Efectul cancerigen al oncogenelor este consecinţa alterării funcţiei lor normale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Oncoproteinele sunt localizate în toate compartimentele celulare: *în membrană, în citoplasmă* şi *în nucleu.*

Oncoproteinele din membrana citoplasmatică sunt *integrine,* adică molecule care mediază integrarea celulei în ansamblul tisular, prin răspunsul lor semnalele din mediu. Celula normală se caracterizează prin capacitatea de a recepţiona şi de a răspunde adecvat semnalelor pe care le primeşte din mediul extracelular. Semnalul de creştere ajunge la suprafaţa celulei sub forma unui factor polipeptidic, care se leagă cu receptorul membranar. Adeseori, receptorul celular este o proteină membranară integrată, cu activitate specfică, tirozin-kinazică.

Mecanismul general de acţiune a oncoproteinelor este următorul: după ce au legat o moleculă semnal din exterior, dobândesc proprietăţi fosfokinazice. Molecula receptor se dimerizează, activitatea ei kinazică creşte şi se produce autofosforilarea resturilor de tirozină din secvenţa citoplasmatică. Oncoproteinele transmit semnalul recepţionat, prin fosforilarea unei catene de proteine citoplasmatice, până în nucleu. Receptorul final al semnalului este un factor activator al transcrierii, ce controlează un set de gene.

Oncoproteinele citoplasmatice sunt componente ale catenei de propagare a semnalului recepţionat la suprafaţa celulei.

Oncoproteinele nucleare sunt componentele terminale ale catenei proteice şi au rol în integrarea sintezei ADN, în reglarea transcrierii genelor şi a diviziunii celulare.

Protooncogenele exprimate în condiţiile unui control celular normal nu sunt oncogene. Oncoproteinele au, în acelaşi timp, capacitatea potenţială de a induce transformarea malignă a celulelor în anumite condiţii de dezechilibru al activităţii lor.

Genele *c-onc* sunt active în timpul dezvoltării embrionare şi sunt esenţiale pentru diferenţierea celulară, dar ulterior se represează, unele complet, iar altele sunt transcrise cu o rată foarte scăzută. Toate oncogenele îşi păstrează capacitatea de a-şi relua activitatea şi respectiv, de a şi-o intensifica în diferite condiţii:

- după infecţia cu un virus oncogen;
- sub acţiunea unor factori de mediu (substanţe cancerigene, radiaţii UV sau ionizante);
- mutaţii punctiforme care determină creşterea ratei de transcriere.

Toţi aceşti factori activează potenţialul oncogen al oncogenelor. *Activarea oncogenelor* este numitorul comun al tuturor tipurilor de cancere.

Oncogenele celulare (protooncogene) s-au izolat din ţesuturile normale, iar corespondentele lor malignizante, s-au izolat de la retravirusuri şi din ţesuturi maligne umane. In tabelul de mai jos sunt redate denumirile celor mai reprezentative oncogene retravirale.

Oncogenă	*Virusul transductor*	*Sursa de celule maligne*
Abl	Virusul leucemiei murine Abelson (MuLV)	Limfomul celulelor B de şoarece şi om
Erb A, erb B	Virusul eritroblastozei aviare (VEA)	Fibrosarcom şi leucemie de pui de găină
Fes, fgr,fms	Virusul sarcomului felin	Fibrosarcom felin
Fos	Virusul osteosarcomului murin (FBJ MuSV)	Condrosarcomul de şoarece
Fps	Virusul sarcomului Fujinami (FuSV)	Sarcom de pui de gaina
H-ras	Virusul sarcomului murin Harvey (Ha-MuSV)	Sarcom de şobolan, carcinom uman şi de şobolan
K-ras	Virusul sarcomului murin Kirsten (Ki-MuSV)	Sarcom de şobolan, carcinom şI sarcom uman, leucemii umane
Myb	Virusul mieloblastozei aviare (AEV)	Celule leucemice de pui de găină şi celule leucemice umane
Rel	Virusul reticuloendoteliozei	Leucemie limfoidă de curcan
Sis	Virusul sarcomului simian (VSS)	Sarcom de maimuţă
Src, ski, yes	Virusul sarcomului Rous	Sarcom de pui de găină

Denumirile protooncogenelor sunt prescurtări sau acronime pentru virusurile sau ţesuturile de origine. Aceste gene codifică sinteza unor tirozin-kinaze (src), treonin-kinaze, a unor proteine care se asociază cu ADN (având rol în reglarea replicării sale) sau proteine reglatoare ale creşterii şi diviziunii celulare (similare ca acţiune, factorilor de creştere).

Cea mai cunoscută oncogenă celulară (protooncogenă) este *c-src,* omologă cu gena *v-src* a virusului sarcomului Rous. Gena *c-src* se găseşte la păsări, peşti, mamifere, om.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

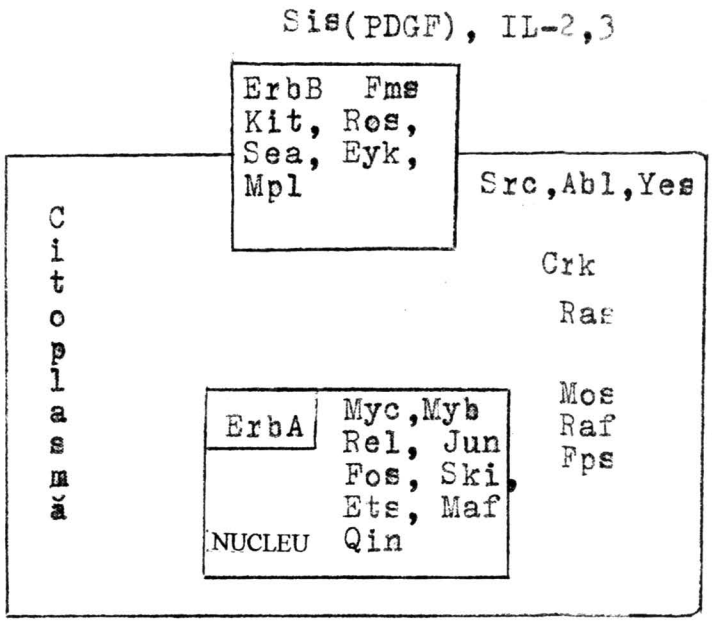


Fig. 188. Oncoproteinele sunt componente ale catenelor care controlează creşterea şi diviziunea celulelor. Produsele oncogenelor retravirale sunt de 7 categorii: *factori de creştere* (Sis); *proteine plasmatice integrate* cu structură de receptori ai factorilor de creştere, care sunt kinaze tirozin-specifice (ErbB, Fms, Kit, Ros, Sea, Eyk, Mpl); *tirozin-kinaze* asociate membranei, care nu au rol de receptori (Src, Abl. Yes); *proteine linker* cu rol adaptor (Crk); *GTP-aze* (Ras); *serin-protein-kinaze citosolice* (Fps); *factori de transcriere* Jun, Fos, Rel, Myb, Myc, Ski, Qin, Maf; *receptori de hormoni* (ErbA).

Pentru originea c-src şi v-src s-au propus două ipoteze:

- gena *c-src*, cu o răspândire atât de largă la organisme foarte diverse, este un derivat al genei *v-src*, ca rezultat al infecţiei în decursul evoluţiei, cu retravirusuri;

- gena *v-src* a fost încorporată de virus din ADN celular şi astfel virusul a dobândit proprietăţi oncogene. Gena *v-src* ar fi un derivat al genei *c-src*. Această ipoteză este sprijinită de faptul că mutantele virale rezultate prin deleţia genei *src*, se multiplică normal.

Genele retravirale oncogene nu conţin introni, în timp ce oncogenele celulare sunt totdeauna discontinui. Există şi alte gene care şi-au pierdut intronii, dar nu se cunoaşte nici una care să-i fi dobândit.

Gena *c-src* este esenţială pentru celulă. Ea codifică sinteza unei tirozin-kinaze (enzima care fosforilează proteinele la nivelul resturilor de tirozină), dar activitatea enzimei este numai 10% din aceea a enzimei codificată de *v-src*.

Oncogenele din celulele maligne îşi au corespondent în celulele normale. Uneori, cele două gene sunt identice, iar alteori se deosebesc printr-o singură pereche de baze. In acest ultim caz, oncogena malignizantă este o mutantă punctiformă a genei normale. Substituţia unui singur aminoacid în proteina codificată, poate converti o protooncogenă într-o oncogenă.

Având în vedere ca proteinele codificate de genele *c-onc* au rol de reglare a creşterii celulare şi de receptori de semnale, se poate deduce că transformarea malignă este consecinţa următoarelor categorii de evenimente:

- schimbarea unei singure baze prin mutaţie punctiformă, determină apariţia unei variante genice, care la rândul ei produce creşterea sau diminuarea activităţii oncoproteinei. Dacă proteina este un factor de creştere, sinteza sa crescută, intensifică rata creşterii şi diviziunii celulare. Dacă oncoproteina are rolul de a stopa sinteza unui inhibitor al creşterii, inactivarea prin mutaţie a oncogenei, elimină controlul asupra factorului inhibitor şi creşterea celulară devine necontrolată;

- oncoproteina codificată de gena normală, poate fi instabilă, activitatea sa fiind reglată de rata sintezei şi degradării. Oncoproteina codificată de gena mutantă, se poate modifica astfel încât rata degradării ei să se diminueze, fără modificarea activităţii biochimice. Activitatea latentă a oncoproteinei va creşte.

În cazul în care oncogena (din ţesutul malign), nu diferă de corespondenta ei normală, aceste mecanisme ipotetice de acţiune nu se aplică. Studiile de biologie celulară au evidenţiat că anumite funcţii biologice, nu sunt determinate de prezenţa unui anume produs genic, ci de concentraţia produsului respectiv. Rezultă deci, posibilitatea ca, conversia unei protooncogene la oncogena activă să fie rezultatul schimbării concentraţiei unui factor reglator al activităţii protooncogenei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cantitatea unui produs genic, conţinut într-o celulă, este determinată de raportul dintre rata sintezei şi cea a degradării sale. Rata sintezei celor mai multe proteine este determinată de rata sintezei ARNm. S-a demonstrat că activitatea unei gene (rata transcrierii sale) poate fi modificată prin alterarea promotorului adiacent şi/sau a secvenţei reglatoare. De fapt, unele oncogene diferă de protooncogena normală, numai prin modificarea secvenţei de baze a promotorului. Schimbarea secvenţei de baze, probabil, alterează rata transcrierii.

Un alt mecanism prin care se poate altera expresia protooncogenelor, este deplasarea lor într-o nouă localizare, prin reaşezarea unei gene lângă un alt promotor, sau prin separarea de un element reglator adiacent. Este posibil ca o protooncogenă să devină oncogenă, când intră sub acţiunea reglatoare a promotorului viral, care poate avea o activitate semnificativ superioară promotorului normal. După inserţia ADN viral într-un cromosom al celulei, oncogena poate fi exprimată la o rată mai înaltă decât protooncogena.

Mecanismele transformării maligne cu virusuri oncogene

Transformarea malignă a celulelor, cu virusuri oncogene are câteva caracteristici comune:

- o singură particulă virală este suficientă pentru transformarea celulei;
- genomul viral, întreg sau parţial, persistă în celula transformată, dar virusul progen nu este produs totdeauna;
- în celula transformată se exprimă cel puţin o parte a genomului viral;
- transformarea este rezultatul alterării recepţiei semnalelor de creştere celulară normală;
- fenotipul celulei transformate poate fi reversat la cel normal, prin interferenţa specifică cu funcţiile moleculelor virale efectoare.

Oncogeneza cu retravirusuri

Interacţiunea oncogenelor celulare cu retravirusurile oncogene a furnizat singura cale de acces pentru studiul acestor gene.

In raport cu capacitatea lor de a îngloba oncogene celulare în genom, retravirusurile oncogene aparţin următoarelor două grupe:

- retravirusuri *transductoare* sunt acelea care poartă oncogene celulare în genomul lor;
- retravirusuri *netransductoare*, caracterizate prin absenţa oncogenelor celulare în structura lor genomică.

Oncogeneza cu retravirusuri transductoare

Retravirusurile transductoare poartă în genomul lor gene oncogene (*v-onc*), foarte asemănătoare, până la identitate cu genele *c-onc*. Analiza secvenţei de baze şi tehnicile de hibridare moleculară au evidenţiat asemănarea între genele *v-onc* şi *c-onc*.

Aproape toate virusurile transductoare au pierdut o parte din informaţia genetică proprie, prin schimbul cu secvenţe celulare şi de aceea ele sunt defective cu privire la desfăşurarea ciclului de replicare, fiind dependente de un virus helper. Au o eficienţă foarte mare de transformare a celulelor *in vitro*, iar *in vivo* produc tumori la câteva zile după inoculare.

Dovezile experimentale privind originea celulară a genelor *v-onc* s-au obţinut pentru gena *v-src* a virusului sarcomului Rous (VSR). Studiile de hibridare moleculară au argumentat că gena *v-src* nu este virală, ci este de origine celulară. Rezultatele se pot extrapola pentru toate oncogenele *transduse* de retravirusuri.

Fiind de origine celulară, genele *v-onc* nu sunt esenţiale pentru replicarea virusului. Gena *v-src* transdusă de VSR, se adaugă întregului set de gene virale şi virionii transductori nu sunt defectivi pentru ciclul de replicare. Deleţia genei *v-src* nu influenţează capacitatea de replicare a VSR.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virionul are rolul unui vehicul transductor pentru oncogenele de origine celulară. După ce au fost transduse într-o nouă celulă, transcrierea lor este controlată de genomul viral.

Fenomenul transducţiei este un eveniment rar. Mecanismul transducţiei genelor celulare este ipotetic. Se admite că integrarea genomului viral ca provirus, are loc în proximitatea unei oncogene celulare, în amonte în raport cu promotorul ei, în aceiaşi orientare de transcriere. Transcrierea genomului viral, catalizată de aparatul enzimatic al celulei, se extinde asupra oncogenei celulare, deoarece gena *c-onc* trece sub controlul promotorului viral. Astfel, este transcrisă o moleculă de *ARN himeră, care conţine atât copia provirusului cât şi a oncogenei celulare*. Copia de ARN este prelucrată prin mecanismul clivării şi înădirii (intronii sunt excizaţi) şi ARN himeric va forma genomul virionilor progeni.

La VSR, oncogena *src* de origine celulară, se adaugă genomului viral complet. Celelalte virusuri transductoare sunt *defective*, deoarece în capsidă poate fi împachetată o cantitate limitată de ARN genomic. O parte a informaţiei genetice virale, este înlocuită de genele transduse. Din această cauză, virusurile transductoare sunt defective în privinţa capacităţii de replicare.

Oncogenele de origine celulară sunt transduse sub forma unei copii de ARN. Un virus transduce *o singură genă*, rareori două. Genele *onc* transduse de retravirusuri sunt cei mai eficienţi agenţi ai transformării maligne.

Retravirusurile defective realizează revers-transcrierea, integrarea, sinteza ARN şi traducerea. Ele sunt oncogene, dar nu se produce virus progen. Numai dacă aceiaşi celulă este infectată de un retravirus cu ciclu complet de replicare, se suplinesc deficienţele virusului defectiv şi se asamblează virus progen.

Oncogenele de origine celulară s-au găsit numai la subfamilia *Oncovirinae*, dar lipsesc la *Lentivirinae* şi *Spumavirinae*, deşi treptele replicării sunt aceleaşi.

Mecanismele transformării maligne sub acţiunea retravirusurilor transductoare, sunt multiple. În acord cu *teoria supradozajului*, transformarea malignă este rezultatul sintezei în exces a oncoproteinelor codificate de gnele transduse. Eficienţa transformantă a retravirusurilor transductoare, derivă din faptul că genele *v-onc*, fiind sub controlul promotorului viral, sunt transcrise cu o rată superioară, comparativ cu genele *c-onc*.

Genele *v-onc* codifică sinteza unor *oncoproteine modificate*. De exemplu, gena *v-src* codifică o protein-kinază uşor modificată, faţă de protein-kinaza codificată de gena *c-onc*, dar este transcrisă cu o rată net superioară.

Protein-kinaza din celulele normale este o fosfoproteină de 60 kD, inserată în membrana citoplasmatică şi nu are, în mod obişnuit, proprietăţi transformante. Proteinele fosforilate la nivelul tirozinei, în celula normală, au rolul de a lega Ca^{2+} şi funcţionează ca receptori pentru fibronectină.

Protein-kinaza codificată de gena *v-src*, este uşor modificată faţă de cea normală: ultimii 19 aminoacizi ai capătului C-terminal al proteinei *C-src* sunt înlocuiţi cu o secvenţa de 12 aminoacizi în proteina *V-src*. Modificarea are consecinţe asupra efectului sau reglator.

O altă proteină modificată este *vinculina*. In celulele normale se găseşte la nivelul dezmosomilor (plăcile de aderenţă intercelulară) şi este nefosforilată. La nivelul dezmosomilor se inseră fasciculele de microfilamente ale citoscheletului. In celulele maligne, vinculina este fosforilată şi este mai puţin eficientă în legarea microfilamentelor. Alterarea citoscheletului, explică aderenţa scăzută a celulelor maligne, mobilitatea lor crescută şi capacitatea lor de a se deforma cu uşurinţă, ceea ce condiţionează capacitatea de metastazare.

Genele *v-onc*, originare în celulă, la un nou ciclu infecţios se integrează concomitent cu provirusul, într-o nouă localizare cromosomală, în ambianţa altor gene celulare. Modificarea poziţiei genei, este unul din mecanismele prin care o genă celulară transdusă devine oncogenă.

Oncogeneza cu retravirusuri netransductoare

Multe retravirusuri care nu realizează transducţia oncogenelor celulare induc tumori după inoculare experimentală la animale: sarcoame, leucemii, carcinoame. Diferenţa majoră faţă de virusurile oncogene transductoare, constă în perioada de latenţă care precede apariţia

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

tumorilor: de la câteva săptămîni, la câteva luni. Nici unul dintre virusurile netransductoare nu induce transformarea malignă a celulelor *in vitro*. Cel mai cunoscut reprezentant al acestui grup este virusul leucozei aviare. Tumorile induse de retravirusurile netransductoare au câteva proprietăţi definitorii:

- toate celulele unei tumori conţin genomul integrat ca provirus
- provirusul este integrat în acelaşi situs cromosomal, în toate celulele tumorii
- celulele tumorii sunt identice din punct de vedere genetic, având originea într-o singură celulă transformată.

Integrarea provirusului se face la situsuri specifice ale unui cromosom, în imediata vecinătate a oncogenelor celulare, ca şi genomul virusurilor transductoare. Consecinţa directă a integrării genomului viral, este *mutageneza prin inserţie*. Integrarea genomului viral este mutagenă, deoarece modifică secvenţa de ADN. Mutaţiile induse în oncogenele celulare pot avea două efecte: stimulează activitatea unei gene sau o inactivează. Modificarea activităţii oncogenelor celulare constituie esenţa mecanismului molecular al transformării maligne şi a fost explicată prin două teorii:

1) *teoria supradozajului* consideră că transformarea malignă este rezultatul stimulării activităţii unei oncogene şi a sintezei în exces a oncoproteinei pe care o codifică. Gena *c-onc* din imediata vecinătate a situsului de integrare a provirusului trece în subordinea genelor reglatoare virale şi va fi transcrisă cu o rată superioară celei normale. In consecinţă, oncoproteina corespunzătoare se sintetizează în exces şi perturbă rata diviziunii celulare. Diviziunile celulare se activează necontrolat sub acţiunea stimulatoare a oncoproteinei reglatoare în exces;

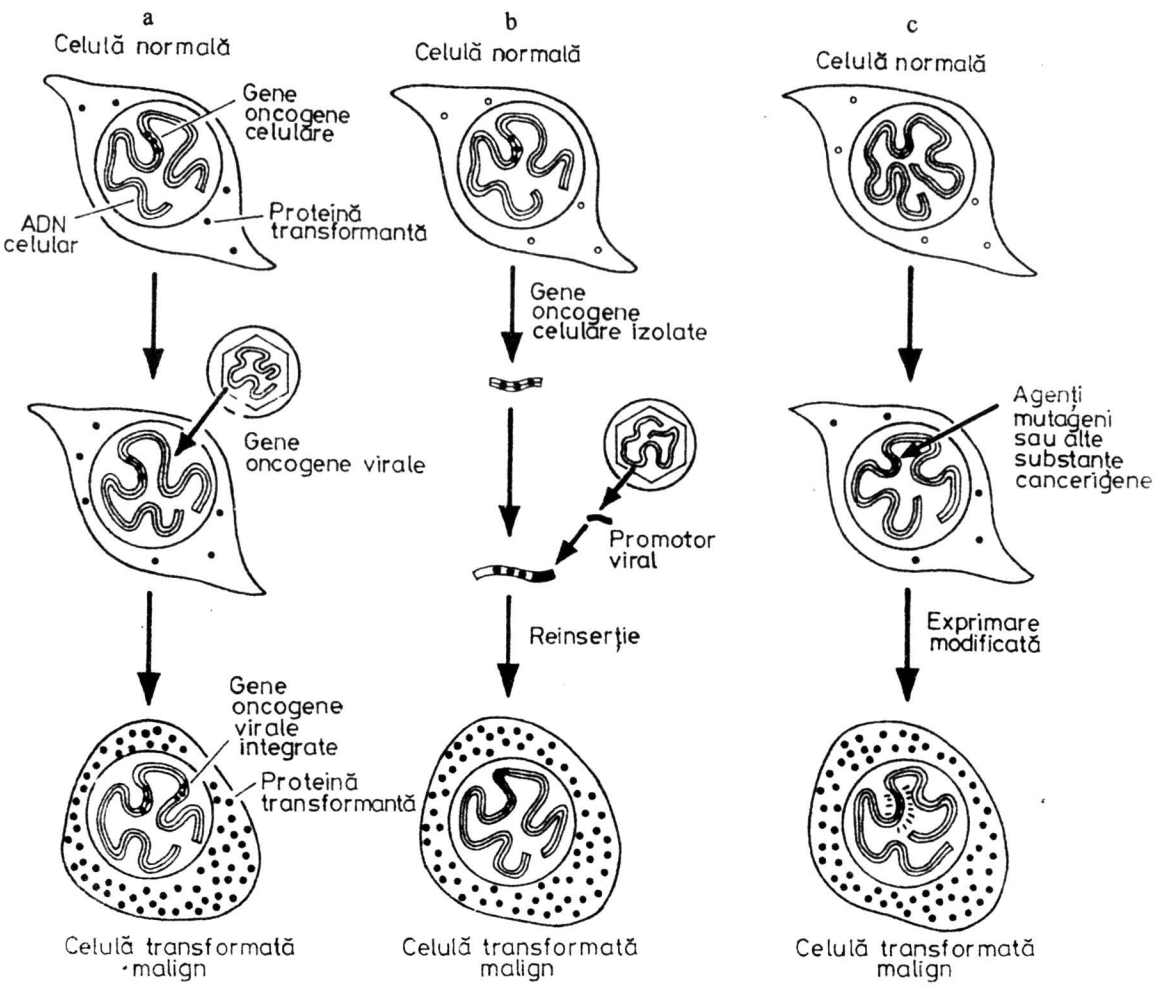


Fig. 189. Ipoteza supradozajului. Oncogenele celulare codifică sinteza unor proteine necesare creşterii normale. Transformarea malignă poate fi rezultatul supraproducţiei proteinei normale, sintetizată de oncogenele virale după infecţie (a). În anumite cazuri, oncogenele celulare au ele însele potenţial transformant, fapt demonstrat prin legarea unui promotor viral de oncogena celulară, care astfel devine mai activă. După reinserţie în celule cultivate, acestea secretă cantităţi mari de oncoproteine. Consecinţa este transformarea malignă a celulelor (b). Mutagenii chimici şi substanţele cancerigene pot converti celulele normale în celule tumorale, mărind activitatea oncogenelor celulare şi, implicit, sinteza produsului proteic al acestora (c) (după Bishop, 1982).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) *teoria activării genelor c-onc* sub acţiunea inductoare a provirusului consideră că genele *c-onc*, în mod obişnuit sunt parţial sau total represate, dar se activează după integrarea provirusului în imediata lor vecinătate. Se sintetizează oncoproteine, inductoare ale transformării maligne. Acesta este fenomenul *activării prin inserţie* sau al *cis-activării oncogenelor celulare*, consecutiv trecerii lor sub controlul promotorului viral.

Un alt efect al mutagenezei prin inserţie este *inactivarea antioncogenelor*. Antioncogenele sunt gene care codifică proteine, al căror rol este menţinerea funcţiilor normale ale celulei. Produsele genice au rol de supresori ai protooncogenelor celulare (sunt proteine supresoare). Genele inactivatoare ale protooncogenelor se numesc *antioncogene*. De exemplu, retinoblastomul (o neoplazie a copilăriei), semnifică apariţia tumorii pe retină şi se datorează pierderii ambelor copii ale genei *rb*. Fosfoproteina *RB*, cu localizare nucleară are rol important în reglarea ciclului celular, controlând într-un mod necunoscut, intrarea celulei în ciclul mitotic. Absenţa proteinei *RB*, are ca efect proliferarea necontrolată a celulelor retiniene.

Gena p-53, supresoare a oncogenelor poate fi inactivată prin inserţia unui provirus la ambele alele, sau prin combinarea unui eveniment de inserţie, cu pierderea celeilalte alele prin deleţie.

Genele *c-onc* se pot activa independent de infecţia virală sub acţiunea *mutaţiilor*, chiar *punctiforme*, care apar în interiorul lor. Substituţia unui singur aminoacid al oncoproteinei este suficientă pentru a converti o oncoproteină reglatoare, într-o proteină cu caracter transformant.

Activarea oncogenelor ar putea fi rezultatul *translocaţiei unei protooncogene* într-o nouă localizare cromosomală. De exemplu, în celulele limfomului Burkitt, schimbul de fragmente între cromosomii perechii 8 şi 14 are o frecvenţă de 90% printre pacienţi. Schimbul între cromosomii perechilor 8 şi 2, ca şi între perechile 8 şi 22 are o frecvenţă de 5%. In toate cazurile are loc translocaţia unui fragment al unui cromosom din perechea numărul 8. Acest fragment conţine protooncogena *c-myc*, care astfel este translocată adiacent faţă de o genă reglatoare a sintezei anticorpilor. In noua lcalizare a genei, oncoproteina *c-myc* este sintetizată în exces.

Oncogenele celulare mediază transformarea malignă indusă de virusuri, dar şi de factorii fizici şi chimici cu acţiune mutagenă.

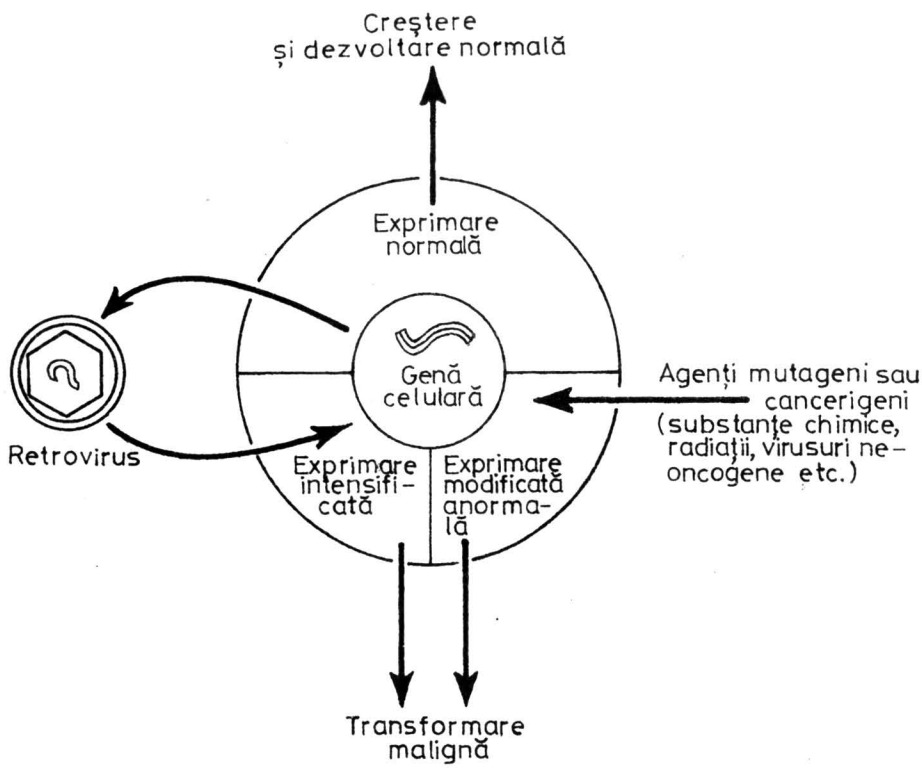


Fig. 190. Explicarea unitară a diferitelor malignităţi, bazată pe conceptul oncogenelor celulare. Elementul central comun îl constituie un grup de gene celulare reglatoare ale proceselor de creştere şi dezvoltare normală. După ce sunt preluate în genomul unui retravirus (stânga), acestea devin oncogene virale. Funcţionarea lor mai poate fi alterată şi/sau intensificată de diferite substanţe mutagene sau cancerigene (după Bishop, 1982).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Infecţiile cu retravirusuri potenţial oncogene, la om şi animale sunt mult mai frecvente decât incidenţa tumorilor. Pentru ca transformarea malignă a celulei să se producă, este necesar ca simultan cu infecţia virală, să acţioneze alţi factori cu efect sinergic, denumiţi factori *cocarcinogeni*. Aceştia pot fi factori intrinseci (genetici, hormonali, imunologici) sau factori ai mediului extern (substanţe chimice potenţial cancerigene, radiaţii). Factorii cocarcinogeni interni sau externi potenţează evoluţia spre malignizare a infecţiei cu virusuri oncogene.

INTERACŢIUNEA ONCONADVIRUSURILOR CU CELULELE

Un număr mare de virusuri cu genom ADN, infecţioase în mod natural pentru o largă varietate de specii animale şi pentru om au capacitatea de a induce transformarea malignă a celulelor *in vitro* sau să inducă tumori la animalele de laborator. Unele determină formarea tumorilor chiar la gazdele lor naturale.

Virusurile oncogene ADN cuprind:

1) Papilomavirusuri (peste 60 de serotipuri izolate de la om şi numeroase papilomavirusuri animale).

2) Poliomavirusuri (SV_{40}, polioma şi virusurile BK şi JC)

3) Adenovirusuri (cu numeroase variante antigenice umane şi animale).

4) Herpesvirusuri (virusul Epstein-Barr, herpesvirusul bolii lui Marek, al carcinomului renal Lucké al broaştei leopard).

5) Virusurile hepatitice (virusul hepatitei B umane).

Polioma şi adenovirusurile au activitate transformantă numai în sistemele experimentale *in vitro*, dar nu au rol demonstrabil în inducerea tumorilor umane sau animale. Unele oncodnavirusuri induc cancere umane (carcinomul cervixului uterin, indus de papilomavirusuri, limfomul Burkitt şi carcinomul nazofaringian, produse de virusul Epstein-Barr, iar virusul hepatitei B este asociat cu carcinomul hepatocelular).

Toate virusurile oncogene ADN au simetrie icozaedrică, cu dimensiuni cuprinse între 40-100 nm şi sunt nude, cu excepţia herpesvirusurilor.

Spre deosebire de retravirusuri, la care oncogenele sunt de origine celulară, genele transformante ale oncodnavirusurilor sunt *gene virale esenţiale* pentru desfăşurarea ciclului de replicare virală. Ele nu au corespondenţă printre genele celulare normale. Genele virale oncogene (transformante) au fost caracterizate prin evidenţierea rolului lor în ciclul multiplicării acestor virusuri.

Proprietăţile oncogene ale oncodnavirusurilor nu sunt asociate cu capacitatea de a produce virus progen.

Virusurile oncogene ADN interacţionează cu celulele, în două modalităţi distincte:

1) *Infecţia productivă*, în cursul căreia virusul se multiplică *în celulele permisive* ale gazdei naturale şi se eliberează virus progen. Consecinţa multiplicării virusului este liza celulei.

2) *Infecţia transformantă* (neproductivă), în cursul căreia, virusul nu se multiplică (nu se produce virus progen) are loc *în celule nepermisive*, care provin de la organisme pe care virusul nu le infectează în condiţii naturale. Rezultatul interacţiunii virusului cu celula nepermisivă, poate fi *infecţia abortivă*, fără consecinţe detectabile sau *transformarea malignă*.

Cercetările de genetică moleculară au evidenţiat ca genomul virusurilor oncogene ADN, din punct de vedere funcţional, poate fi împărţit în mod convenţional, în două regiuni distincte, în raport cu momentul transcrierii lor:

a) gene timpurii, a căror transcriere precede replicarea ADN;

b) gene tardive, care sunt transcrise după replicarea genomului viral.

Pornind de la aceste concluzii s-a dedus că interacţiunea oncodnavirusurilor cu celula, este modulată genetic. In celulele permisive sunt transcrise ambele programe genetice. Se sintetizează molecule de ARNm timpurii şi tardive, care sunt traduse în proteine corespunzătoare. Ciclul multiplicării virale este complet. Se asamblează şi se eliberează virus progen.

În celulele nepermisive, este transcrisă informaţia genetică timpurie şi numai parţial, programul tardiv al genomului viral. După transcrierea strict limitată a informaţiei genetice, un

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

factor celular blochează transcrierea celorlalte gene ale programului tardiv. Ciclul multiplicării virale este stopat şi nu se asamblează virus progen. Informaţia genetică virală rămâne în celulă şi îi conferă acesteia, proprietăţi noi, care se materializează în transformarea malignă.

Mecanismele generale ale transformării maligne cu oncodnavirusuri

Transformarea malignă cu virusuri oncogene ADN este un eveniment rar (sub $1/10^5$) şi necesită un mare număr de particule virale infecţioase/celulă. Ineficienţa procesului de transformare, reflectă absenţa mecanismelor specifice de integrare a ADN viral în cromosomii celulei. Genele virale oncogene au o probabilitate mică să fie integrate într-o stare care să permită transcrierea.

Mult mai frecventă este *transformarea abortivă*, caz în care, infecţia celulelor nepermisive este urmată de exprimarea genelor timpurii. Tranzitoriu, celula dobândeşte caractere care denotă procesul de transformare, dar ulterior reversează la fenotipul normal şi ADN viral se pierde.

Pentru ca transformarea malignă să se producă, genele virale trebuie să rămână asociate cu celula, fie sub forma unei plasmide fizic independentă, fie sub forma integrată în cromosomul celulei. Proteinele codificate de genele virale oncogene, sunt necesare permanent pentru menţinerea fenotipului transformant al celulei.

Condiţia transformării maligne este întreruperea transcrierii genelor virale tardive.

Oncodnavirusurile mediază efectul transformant prin *oncoproteinele* pe care le codifică şi se sintetizează în celulele infectate. Oncoproteinele stimulează celulele aflate în faza G_0 să intre în ciclul celular. De exemplu, adenovirusurile infectează celulele epiteliale diferenţiate terminal ale tractului respirator superior, în care precursorii moleculari ai replicării genomului viral sunt în cantitate limitată. De aceea, adenovirusurile stimulează celula să intre în faza S a ciclului, creind astfel un mediu celular favorabil replicării ADN (prin inducerea sintezei ADN celular, a enzimelor ce catalizează sinteza dezoxiribonucleotidelor, ribonucleotid-reductaza, timidin-kinaza, ADN-polimeraza, dihidrofolat-reductaza). Stimularea intrării celulei în faza S este rezultatul sintezei unor proteine codificate de gene virale. Dacă celula este permisivă, infecţia este productivă, iar dacă este nepermisivă, inducerea fazei S a ciclului celular este suficientă pentru transformare.

Detectarea ADN integrat. În studiul interacţiunii transformante virus-celulă se urmăreşte detectarea ADN viral, integrat sau în stare fizic autonomă, numărul şi localizarea secvenţelor de ADN viral, în celula transformată.

Dovada concludentă a prezenţei ADN viral în celulele transformate este adusă de experienţele de hibridare prin metoda *Southern blotting* (ADN este în gel, iar ARN marcat, cu secvenţa cunoscută este utilizat ca probă). ARN marcat (radioactiv sau cu digoxigenină), obţinut prin transcrierea *in vitro* a ADN viral (polioma, SV_{40} etc.) hibridează cu ADN izolat din celulele transformate cu virusul corespunzător, dar nu hibridează cu ADN izolat din celulele normale.

ADN viral se poate integra sau rămâne sub formă fizic independentă în celulele transformate malign.

Pentru hibridare, ADN din celulele transformate cu un oncodnavirus se purifică şi se secţionează la situsuri întâmplătoare. Rezultă fragmente cu un spectru larg al greutăţii moleculare, dar mai mari decât al ADN viral. Fragmentele sunt fracţionate prin centrifugare zonală şi fiecare fracţie se testează pentru prezenţa ADN viral, prin denaturare şi hibridare cu ARN viral marcat.

Fragmentele de ADN celular care conţin ADN viral integrat, pot avea dimensiuni foarte diferite. De aceea, ARN marcat (din probă) hibridează cu fragmente de ADN de orice dimensiuni.

Dacă ADN viral se găseşte în celulă în stare fizic autonomă, toate copiile sale sedimentează unitar, datorită uniformităţii masei moleculare a copiilor.

Pentru SV_{40}, ADN viral integrat în ADN celular s-a identificat cu ADN viral denaturat, marcat cu P^{32}. Aceste experienţe au evidenţiat că ADN de SV_{40} se integrează la un singur situs

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cromosomal, dar unele celule transformate conţin două secvenţe de ADN SV_{40}, integrate la situsuri cromosomale diferite.

Experienţele de fuziune celulară, mediată de virusul Sendai, arată că genomul virusului SV_{40} se integrează în mai multe situsuri diferite ale ADN celular, situsuri care se găsesc pe mai mulţi cromosomi. Celulele umane şi de şoarece, a căror fuziune este indusă de virusul Sendai, formează hibrizi instabili care pierd la întâmplare cromosomii umani, până ce rezultă linii stabile ce au setul complet de cromosomi de şoarece şi numai câţiva cromosomi umani. Celulele normale de şoarece au fost fuzionate cu celule umane transformate cu SV_{40}. S-au obţinut clone stabile, ce se aseamănă cu celulele de şoarece, dar sunt transformate. Cromosomii umani se disting uşor de cei de şoarece în metafază. Pe această cale, celulele transformate de şoarece, pot fi analizate pentru identificarea cromosomilor umani pe care îi conţin. Analiza mai multor clone de celule a sugerat ca ADN de SV_{40} este integrat în mai mulţi cromosomi.

Structura ADN viral integrat. Pentru oncodnavirusuri, integrarea genomului viral într-un cromosom celular nu este esenţială pentru desfăşurrarea ciclului de multiplicare şi se produce numai în cazul unei infecţii abortive. Integrarea ADN viral are cele mai mari şanse să se producă în celulele nepermisive. Deoarece ciclul multiplicării este stopat, nu există presiune selectivă pentru păstrarea tuturor secvenţelor codificatoare ale genomului viral. In unele cazuri, s-a demonstrat ca integrarea este însoţită de pierderea informaţiei genetice virale: se produc deleţii şi inversii.

Cazul extrem al pierderii informaţiei genetice, s-a observat la adenovirusuri. Clonele celulare transformate conţin totdeauna ADN viral integrat, dar secvenţele virale nu reprezintă niciodată o moleculă genomică virală întreagă. Diferitele clone celulare conţin secvenţe virale diferite, dar totdeauna un segment de ADN genomic este prezent în celulele transformate. Aceasta denotă că o anumită genă sau un set de gene virale sunt esenţiale pentru transformare.

Consecinţele integrării. Integrarea genomului viral produce transformarea malignă a celulelor prin câteva mecanisme ipotetice:

1) integrarea poate avea loc într-o genă celulară, care astfel se inactivează. Dacă gena are un rol reglator, consecinţa este perturbarea proceselor celulare dependente de gena inactivată;

2) integrarea genomului viral poate să producă separarea unei gene de promotorul ei şi astfel transcrierea genei este blocată;

3) integrarea poate să pună o genă a celulei sub influenţa unui promotor viral mai activ sau foarte activ şi rezultatul este o supraproducţie a proteinei codificată de o genă;

4) un produs al genei virale poate, direct sau indirect, să determine transformarea;

5) integrarea genomului viral poate provoca ruperea unui cromosom celular şi rearanjarea lui, astfel încât poate altera expresia genelor.

Virusurile oncogene se deosebesc de fagii lizogeni prin faptul ca nu au represori, iar transcrierea ADN integrat se produce continuu. Bacteriofagul integrat necesită sinteza unui *represor* propriu pentru menţinerea stării lizogene, adică pentru prevenirea activării funcţiilor virale, ce produc liza bacteriei. La retravirusuri, represorul nu este necesar, deoarece celula transformată este concomitent producătoare de particule virale progene. La oncodnavirusuri, absenţa represorului are altă explicaţie. Toate virusurile oncogene ADN au un program de transcriere timpurie şi unul de transcriere tardivă. Programul transformant corespunde programului timpuriu şi transcrierea sa are loc permanent, fiind necesară pentru menţinerea stării transformate.

Transformarea cu papovavirusuri

Familia *Papovaviridae* cuprinde două genuri: *Pa*pilomavirus, *Po*liomavirus, care la rândul său include şi virusurile *va*cuolante (SV_{40}).

Virusul simian 40 (SV_{40}) infectează în mod natural, rinichiul maimuţelor de *Cercopithecus aetiops* şi *Macaccus rhesus*, iar virusul polioma este endemic la şoarecele de laborator. Nu produc îmbolnăviri decelabile la gazdele naturale. Ciclul de replicare este litic şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

se eliberează virus progen. Ambele virusuri induc tumori la puii de şoarece, de hamster, de şobolan sau *in vitro* transformă celulele lor.

Poliomavirusurile umane BK şi JC infectează timpuriu în copilărie şi sunt ubicvitare în populaţia umană. Infecţia primară cu aceste virusuri nu determină manifestări clinice, dar în condiţiile unei imunosupresii prelungite, virusul JC poate determina o maladie demielinizantă, *leucoencefalopatia progresivă multifocală*. Virusul BK şi rareori virusul JC produc infecţii hemoragice ale tractului urinar.

Virusul polioma infectează şoarecele, hamsterul, maimuţele, bovinele, păsările. In mod obişnuit, produce infecţii persistente inaparente. După inoculare la rozătoarele nou născute, virusul polioma produce o varietate de tumori.

Genomul poliomavirusurilor este o moleculă de ADN circular, de 4,7-5,2 kb. Virionii sunt nuzi, cu simetrie icozaedrică. Funcţional, genomul cuprinde un set de gene transcrise timpuriu şi un set de gene transcrise tardiv. In celulele permisive sunt transcrise ambele programe, iar în celulele nepermisive sau semipermisive este transcris numai setul de gene al programului timpuriu, codificatoare pentru *antigenele T* (*T*umorale). Antigenele T sunt proteine oncogene. Sinteza numai a antigenelor T determină transformarea malignă a celulei.

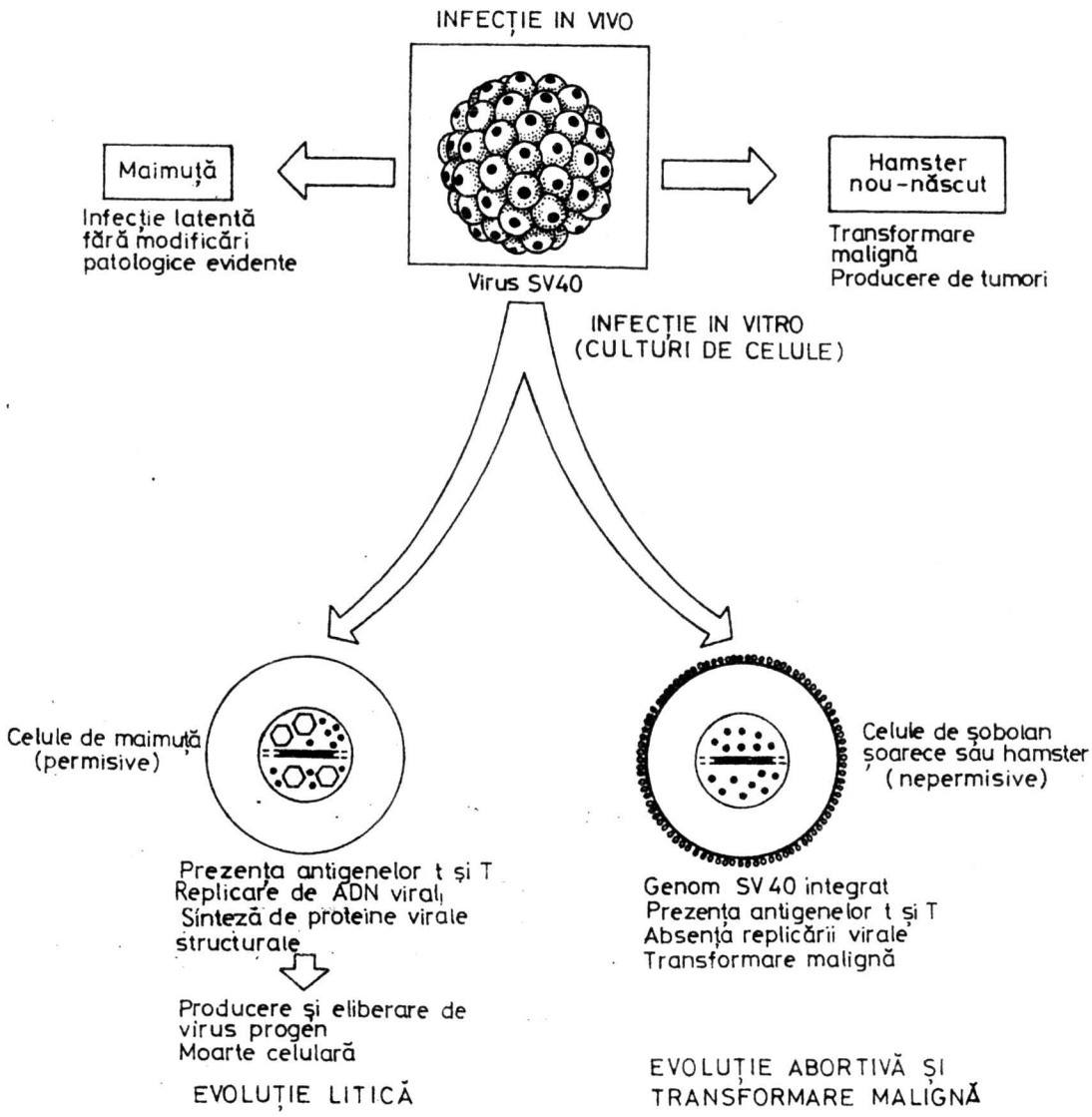


Fig. 191. Reprezentarea diagramatică a evoluţiei infecţiilor cu virusul SV_{40}, în funcţie de natura celulelor şi a organismelor gazdă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Programul timpuriu al virusurilor polioma, codifică sinteza a două antigene: *antigenul mare* (*T*) şi *antigenul mic* (100 şi respectiv 17 kD). Virusul polioma infecţios pentru şoarece şi hamster codifică sinteza a trei antigene: mare, mijlociu şi mic. Antigenele *T* sunt proteine oncogene şi stimulează creşterea şi diviziunea celulei infectate.

Antigenul *T* de 100 kD are o localizare aproape exclusiv nucleară, atât în celulele infectate, cât şi în cele transformate. Proteina de 100 kD se asociază cu ADN viral şi reglează câteva trepte cheie ale ciclului de multiplicare: transcrierea ARNm timpuriu şi tardiv, replicarea ADN. Antigenul viral se asociază şi cu proteina p53 – o fosfoproterină nucleară, cu rol inhibitor al diviziunii celulare. După formarea complexului, funcţiile reglatoare ale proteinei p53 sunt anulate.

Antigenul *T* mijlociu (55 kD) este o proteină fosforilată, care se asociază cu proteina celulară de 60 kD (p60), codificată de protooncogena *c-src*, o kinază tirozin-specifică. Interacţiunea *p60* cu antigenul viral, determină o stimulare de circa 50 de ori a activităţii tirozin-kinazice a proteinei *Src* şi concomitent, perturbarea mecanismului său de reglare negativă.

SV_{40} codifică sinteza unei proteine de 94 kD, cu localizare predominant nucleară, căreia i se atribuie câteva funcţii:

- se asociazaă specific cu genomul viral şi are rol în iniţierea replicării acestuia;
- controlează transcrierea programului timpuriu şi tardiv;
- are activitate ATP-azică
- stimulează sinteza enzimelor de replicare a ADN;
- se inseră în membrana plasmatică şi se comportă ca antigen de transplantare specific tumoral.

Curând după infecţia virală, atât în celulele permisive cât şi în cele nepermisive are loc creşterea accentuată a enzimelor ce catalizează sinteza ADN. Creşterea este detectabilă chiar în celulele blocate în faza G_1 (celule în care sinteza ADN este stopată). Enzimele iniţiază nu numai sinteza ADN viral, ci şi sinteza ADN celular.

Transformarea cu papilomavirusuri

Papilomavirusurile prezintă un interes ştiinţific şi practic deosebit. Ele infectează multe specii de vertebrate, fiind reunite prin capacitatea lor de a produce tumori benigne epiteliale şi fibroepiteliale la gazdele lor naturale. Tumorile, denumite *papiloame* (negi, veruci) pot progresa uneori spre carcinoame, prin proliferare după străpungerea membranei bazale. Aceste virusuri s-au izolat de la om, bovine, maimuţă, iepurele de vizuină din vestul SUA, de la diferite specii de păsări.

Originea virală a leziunilor papilomatoase a fost intuită de Ciufo (1907). El a evidenţiat că filtratele acelulare ale negilor transmit leziunile. Primul virus al acestui grup a fost descoperit de Shope (1933) la iepurele de vizuină. Virusul produce o papilomatoză cutanată, care în 25% din cazuri, progresează la un carcinom celular squamos, evoluţia malignă fiind accelerată de metilcolantren şi de gudronul de cărbune.

Genomul papilomavirusurilor este o moleculă de ADN dublu catenară, circulară închisă, de 7,2-8 kb. Virionii sunt nuzi, cu simetrie icozaedrică. Nu se multiplică în culturi de celule.

Din punct de vedere funcţional, genomul poate fi împărţit în trei regiuni:

- regiunea de control, ce cuprinde 10% din genom;
- regiunea timpurie *E* (*E*arly) codifică proteine reglatoare ale persistentei genomului, ale replicării ADN şi ale activarii ciclului litic. Proteina codificată de genele E_6/E_7 interacţionează cu proteina p53 şi rezultatul este degradarea rapidă a proteinei celulare;
- regiunea tardivă *L* (*L*ate), codifică proteinele structurale ale capsidei.

La om s-au identificat, cu certitudine, 77 de serotipuri de papilomavirusuri, notate *HPV* (*H*uman *P*apilloma *V*irus), de la 1 la 77, dar numărul total de genotipuri HPV depăşeşte cifra de 100. Creşterea rapidă a numărului genotipurilor identificate este rezultatul direct al utilizării tehnicii PCR. Numeroasele genotipuri se grupează după gradul de omologie a nucleotidelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Subgrupele de virusuri au tropisme pentru situsuri şi ţesuturi specifice. Peste 30 de tipuri genetice formează un subgrup ce infectează mucoasa anogenitală. Alte 20 de tipuri formează alt subgrup ce infectează tegumentul pacienţilor cu *epidermodisplazie veruciformă*, caracterizată prin verucoză extensivă.

HPV_1 şi HPV_4 produc negi plantari, iar HPV_2 produce negi ai mâinii. HPV_6 şi HPV_{11} produc veruci (negi) ai regiunii genitale şi infecţia se transmite pe cale sexuală.

La bovine, maimuţe etc. s-au descris peste 20 de tipuri de papilomavirusuri. Unele produc *papiloame* (tumori benigne derivate din celulele epiteliale), altele produc *fibropapiloame* (tumori benigne formate din celule epiteliale şi din ţesut conjunctiv fibros) sau *fibroame* (tumori benigne formate din ţesut conjunctiv fibros şi fibroblaste proliferante). Papilomavirusul lui Shope produce un papilom cutanat la iepurele de vizuină, care în 25% din cazuri evoluează spre carcinom. In condiţii experimentale, virusul infectează şi iepurele domestic, iar papiloamele progresează spre carcinom în proporţie de 75%.

Papilomavirusurile infectează celulele epiteliului epidermic, capabile de proliferare (de obicei, celulele stratului bazal), prin microleziuni sau la situsurile în care astfel de celule sunt în mod natural expuse la suprafaţă. Aceasta se întâmplă la joncţiunea diferitelor tipuri de epitelii, ca de exemplu, zona de tranzit a cervixului uterin şi la joncţiunea epiteliului laringian, cu cel respirator.

Dezvoltarea verucilor

Papilomavirusurile au un tropism specific pentru celulele epiteliilor squamoase (epitelii cu celule aplatizate), ce constau din *celule stem** nediferenţiate ale stratului bazal şi se diferenţiază treptat spre stadiul terminal, pe măsură ce se apropie de stratul extern. Infecţia iniţială are loc în celulele stratului bazal al epidermei, dar în aceste celule multiplicarea virusului este complet represată. Prin diviziunea celulei bazale, rezultă două celule cu evoluţie diferită: una rămâne în stratul bazal al epidermei şi continuă să se dividă, iar cealaltă intră în stratul suprabazal, nu se mai divide şi va fi împinsă spre suprafaţa epidermei, de alte celule fiice, trecând succesiv prin straturile spinos, granular şi cornos.

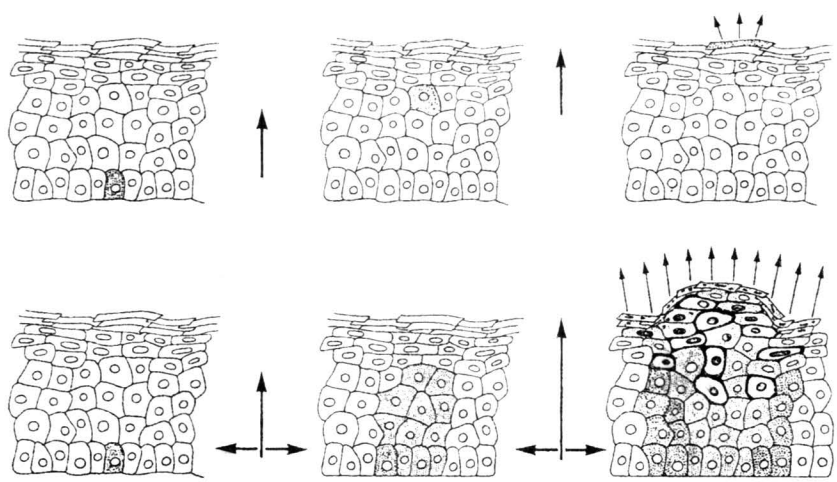


Fig. 192. Reprezentarea schematică a evenimentelor consecutive infecţiei unei celule a stratului bazal cu HPV. În partea de sus, o celulă infectată se diferenţiază fără diviziuni celulare. Ea poate produce virus şi poate fi eliminată. În partea de jos sunt reprezentate consecinţele obişnuite ale infecţiei cu HPV: celula stratului bazal, infectată printr-o microleziune se divide, întârzie procesul de diferenţiere, formează un neg şi, eventual, celulele din straturile superioare ale leziunii produc virus (după Zur Hausen, 1994).

---

* Celula *stem, de origine* sau, *celula mamă* (stem, engl. = tulpina) este nediferenţiată, cu potenţialitate înaltă de diviziune şi diferenţiere. Celulele rezultate prin diviziune se diferenţiază gradat şi dobândesc funcţiile tisulare specifice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După infecţia virală, *celula bazală se transformă*, dobândind un potenţial superior de diviziune. In celula transformată, ADN viral este menţinut în stare fizic autonomă, neintegrat, într-un număr mare de copii (câteva zeci/celulă), rezultate prin replicarea genomului particulei virale infectante. Se exprimă numai genele din programul *timpuriu*, care codifică funcţia replicativă a genomului. Simultan, se produce proliferarea celulelor şi se formează o tumoră benignă. Exprimarea programului tardiv al genomului viral, care codifică sinteza proteinelor structurale, ca şi asamblarea virionilor se realizează în celulele epidermice diferenţiate terminal.

Programul multiplicării virale este strâns lgat de procesul de diferenţiere a celulelor epiteliilor squamoase. Din această cauză, virusul nu s-a putut propaga în culturi celulare. In straturile celulare profunde ale verucilor nu se găsesc virioni. Aceştia se asamblează numai în celulele keratinizate. Există deci, o corelaţie strânsă între stadiul de keratinizare a celulelor epiteliale şi exprimarea programului tardiv al multiplicării virale.

In celulele infectate, aflate în faza proliferativă se exprimă numai genele programului timpuriu. După iniţierea diferenţierii celulare, marcată de începutul keratinizării, se exprimă atât genele timpurii, cât şi genele programului tardiv. In straturile spinos şi granular se sintetizează proteinele capsidei, iar virionii se asamblează în nucleu. Particulele virale se eliberează prin descuamarea celulelor de la suprafaţa leziunii.

Papilomavirusurile sunt implicate în neoplaziile de cervix uterin şi în apariţia altor malignităţi anogenitale, precum şi a unor cancere de piele la pacienţii cu epidermo-displazie veruciformă. Peste 90% din biopsiile de cancer de cervix uterin, recoltate din diferite regiuni ale lumii conţin ADN de HPV_{16} şi HPV_{18} (Bosch, 1995). In circa 2/3 din aceste biopsii, ADN viral este integrat în genomul celulei. Experienţele de transfecţie a keratinocitelor cu genele E_6-E_7, au avut ca rezultat imortalizarea celulelor, cu creştere nelimitată *in vitro*. Comutarea pe poziţia "stop" a activităţii acestor gene a fost urmată de încetarea creşterii celulelor *in vitro* şi incapacitatea lor de a produce tumori prin transplantare *in vivo*.

Transformarea cu adenovirusuri

Cele peste 40 de serotipuri de adenovirusuri umane, formează cel puţin cinci grupe antigenice (A-E). Câteva serotipuri au potenţial oncogen: transformă *in vitro* fibroblastele puilor de rozătoare, iar unele dintre acestea, induc tumori la puii nou născuţi de şobolan sau hamster.

Adenovirusurile umane nu au relaţii demonstrabile cu cancerul la om. In *vitro*, celulele de rozătoare sunt sempermisive pentru multiplicarea adenovirusurilor umane. Pentru exprimarea exclusivă a capacităţii transformante, preparatul viral este mai întâi iradiat, deoarece funcţiile sale litice sunt mai radiosensibile. Frecvenţa apariţiei celulelor transformate malign de adenovirusuri creşte semnificativ sub acţiunea concomitentă a agenţilor care activează mecanismele de excizie-reparare, ceea ce sugerează că integrarea ADN viral este stimulată de procesele reparatorii în curs de desfăşurare.

Genomul adenovirusurilor este dublu catenar, linear şi conţine circa 35 kbp. Interacţiunea transformantă implică integrarea genomului viral la diferite localizări, în ADN cromosomal. Celulele de pui de şobolan şi hamster, transformate cu adenovirusuri conţin genomuri virale incomplete, ceea ce denotă că în interacţiunea cu celulele nepermisive, genomul viral pierde o parte a genelor proprii.

Genele virale transformante aparţin *programului timpuriu* şi reprezintă circa 11% în genom, localizate la extremitatea stângă (regiunea E_1). Regiunea E_1 cuprinde două unităţi de transcriere, E_1A şi E_1B. Ambele sunt transcrise în câteva tipuri de ARNm, prin mecanismul clivării alternative a ARN premesager. Regiunea E_1A este transcrisă în cel puţin două tipuri de ARNm, iar cele două proteine se fosforilează şi sunt localizate în nucleu. Ele reglează sinteza celor două proteine codificate de regiunea E_1B, cu localizare nucleară şi citoplasmatică. Rolul lor în transformarea malignă nu este clarificat, dar conferă capacitatea de supravieţuire a celulelor infectate cu adenovirusuri şi împiedică moartea prin apoptoză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transformarea cu herpesvirusuri

Toate herpesvirusurile transformă celulele *in vitro*, dar numai gama-herpesvirusurile produc tumori la animalele de laborator.

HSV-2 este agentul etiologic al unei infecţii genitale cronice, ce se transmite pe cale sexuală. Femeile cu cancer uterin au o incidenţă mai înaltă a infecţiei şi un titru superior al anticorpilor specifici.

In celulele transformate *in vitro* cu HSV-l sau HSV-2 nu s-au identificat gene transformante, de origne virală. Genele virale se pare că nu sunt necesare pentru menţinerea stării transformate. De aceea, s-a presupus un mecanism particular de transformare, denumit "hit and run" (loveşte şi fugi), ce nu necesită permanenţa genelor virale. Transformarea poate fi consecinţa indirectă a acţiunii mutagene a unei gene virale sau poate să rezulte din activarea unei oncogene celulare. Totuşi, este posibilă prezenţa unui fragment de l-3 kb de ADN viral, ce codifică o funcţie transformantă.

Virusul Epstein-Barr (VEB) a fost descoperit în 1964, de către Epstein, în celulele limfomului Burkitt. Acest virus infectează cea mai mare parte a populaţiei globului, dar rămâne latent, în special în limfocitele B. In cicumstanţe adecvate, VEB poate să contribuie direct la declanşarea câtorva maladii proliferative: mononucleoza infectioasă, limfomul Burkitt şi carcinomul nazofaringian. Ultimele două au caracter malign şi apar în anumite zone geografice şi la anumite grupări etnice, ceea ce implică rolul factorilor de mediu şi al celor genetici.

Genomul VEB este o moleculă de ADN dublu catenar, linear, dar se circularizează în celulă, prin legarea secvenţelor terminale repetate. Genomul cuprinde patru regiuni distincte: regiunile *L* (*L*ong) şi *S* (*S*hort) separate prin secvenţele interne repetate invers (IR), iar la capete, secvenţele terminale repetate invers (TR).

VEB are proprietăţi oncogene *in vivo* şi *in vitro*. Transformă eficient limfocitele B umane şi ale celorlalte primate *in vitro* şi rezultă *linii celulare stabilizate*, cu creştere indefinită şi tumorigene pentru maimuţe.

Studiile seroepidemiologice sprijină, dar nu demonstrează cert, că VEB este agentul etiologic al limfomului Burkitt (o tumoră a maxilarului), care apare la copii între 4 şi 15 ani, în ţările Africii tropicale, pe fondul imunologic stimulat cu agentul paludismului. In Uganda, copiii cu titru înalt al anticorpilor anti-proteine capsidale ale VEB au un risc de 30 de ori mai mare de a dezvolta limfomul Burkitt.

In celulele infectate, se desfăşoară fie ciclul complet al replicării şi rezultatul este liza, fie are loc o infecţie persistentă latentă. In limfocitele B infectate persistent, în limfomul Burkitt şi în carcinomul nazofaringian, genomul VEB are o configuraţie circulară şi este fizic autonom.

In cazul infecţiei latente, sunt transcrise numai regiuni limitate ale genomului. Se sintetizează câteva proteine virale nucleare şi cel puţin una de membrană. Cu o frecvenţă mică, ($1/10^3 - 10^6$), în limfocitele B infectate *in vitro*, se desfăşoară ciclul litic şi se eliberează virus progen.

Factorii genetici au un rol important în dezvoltatea tumorii, ceea ce explică frecvenţa mică a limfomului Burkitt într-o populaţie, în care toţi copiii sunt infectaţi cu agentul malariei şi cu VEB. Activitatea mitogenică a limfocitelor B, datorită stimulării cu antigenele de *Plasmodium* ar uşura infecţia cu VEB.

In celulele limfomului Burkitt, se produce translocaţia unui fragment al cromosomului 8, la unul din cromosomii perechilor l4, 2 sau 22.

Virusul Epstein-Barr este asociat cu *tumori nazofaringiene* de origine epitelială. In aceste celule se poate desfăşura un ciclu litic sau o infecţie latentă transformantă. In ţările temperate, VEB produce mononucleoza infecţioasă, tranzitorie, autovindecabilă.

Virusul bolii Marek. Boala Marek a puilor de găină, este o afecţiune limfoproliferativă şi se manifestă printr-un limfom al limfocitelor T. Virusul infectează latent aceste celule. In *vitro* s-au obţinut linii limfoide T stabilizate şi transformate. Atât *in vivo* cât şi *in vitro*, în celulele transformate, prin tehnicile de hibridare, se detectează 20-l30 secvenţe echivalente genomului viral.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Adenocarcinomul renal al broaştei leopard (*Rana pipiens*), descris de Lucké (1934) este produs de un *Herpesvirus*. Virusul izolat din carcinoamele renale, induce tumori la broaştele sănătoase. Adenocarcinomul renal Lucké prezintă două stări naturale, dependente de temperatură. În sezonul cald, celulele tumorale nu conţin virioni. Virusul progen este produs în celulele tumorii, în sezonul rece. Morfogeneza virală este declanşată experimental, prin scăderea temperaturii la +4° C. In sezonul cald, virusul este prezent în celule ca *provirus* şi produce malignizarea. Replicarea virusului este termosensibilă. La temperatură scăzută, infecţia are caracterul unui proces litic şi se eliberează virus progen.

Se pare că toate herpesvirusurile conţin informaţie genetică potenţial oncogenă, dar în sistemele permisive, exprimarea sa este mascată de efectul litic. Ca şi în cazul adenovirusurilor, genele funcţiei litice sunt mai radiosensibile decât genele oncogene şi pentru relevarea funcţiei transformante, se recurge la iradierea cu UV a preparatului viral.

Transformarea cu hepadnavirusuri

Virusul hepatitei B (VHB) umane este agentul etiologic posibil al *carcinomului hepatocelular* (CHC), una din cele mai maligne neoplazii. Dovezile sunt, în cea mai mare parte, indirecte: riscul de a dezvolta carcinomul hepatocelular primar este de 223 de ori mai mare la purtătorii de virus decât la nepurtători.

Genomul VHB nu pare să conţină oncogene. Perioada de latenţă, între infecţie şi apariţia tumorii este prea lungă pentru ca hepatocarcinomul primar să fie indus de o oncogenă virală. Rămâne posibilitatea ca o proteina activatoare a protooncogenelor, codificată de gena X a VHB să aibă rol în iniţierea procesului de cancerizare.

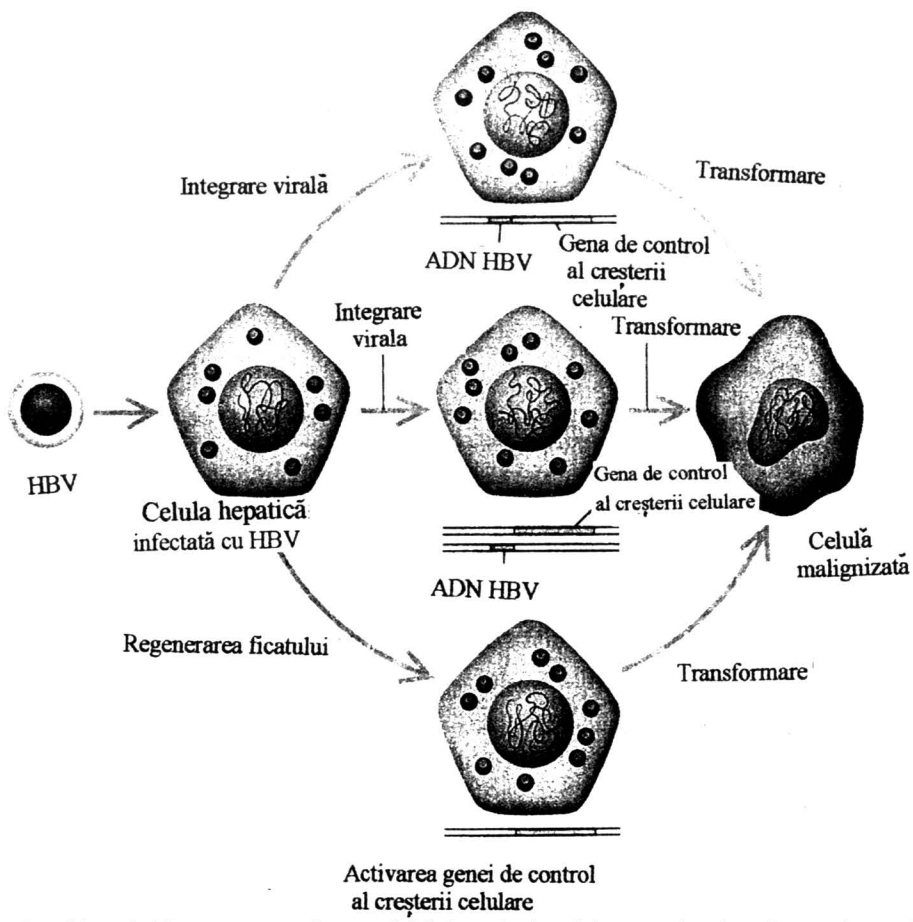


Fig. 193. Virusul hepatitei B ar putea transforma celulele hepatice în celule tumorale prin trei mecanisme: a) ADN viral ar activa genele de creştere celulară prin integrare în vecinătatea lor; b) integrarea ADN viral oriunde în genomul celulei; c) după infecţie, celulele îşi activează propriile gene de creştere (după Dejean, 1991).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virusurile oncogene transformă malign celulele prin integrarea genomului lor în cromosomii celulei. Inserţia secvenţelor virale în vecinătatea oncogenelor celulare perturbă uneori, expresia lor şi poate declanşa creşterea necontrolată. Astfel acţionează, după o perioadă de latenţă, retravirusurile netransductoare ce produc leucemii şi carcinoame la păsări şi mamifere.

Pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare, VHB nu necesită integrarea genomului sau în ADN celular.

Genomul VHB se găseşte integrat în unul din cromosomii hepatocarcinomului la purtătorii cronici ai hepatitei B, dar uneori şi în tumorile pacienţilor fără Ag HBs seric. Deasemenea, ADN al VHB se găseşte integrat în hepatocitele unor purtători cronici de VHB. De aceea se crede că ADN al VHB se integrează înainte de transformarea malignă.

Analiza moleculară, relevă că ADN viral se inseră în cromosomii umani la situsuri diferite. Inserţia determină apariţia rearanjărilor genetice (deleţii, translocaţii, amplificări). Aceste anomalii sunt frecvente în tumorile umane.

ADN al VHB s-a detectat, în stare integrată, în gena ce codifică receptorul pentru acidul retinoic (derivat al vitaminei A), cu rol în diferenţierea şi proliferarea celulară (Dejean, 1991).

La marmotă (*Marmota monax*), ADN al virusului hepatitei este integrat în celulele tumorale. In 30% din cazuri, genomul viral se integrează în vecinătatea oncogenelor celulare *myc*, cu rol în creşterea şi diferenţierea celulară. O parte a genomului viral se inseră lângă *oncogena myc*, fără să producă modificarea informaţiei ei. Dar sinteza proteinei *Myc* este perturbată. Fiind produsă în exces, proteina *Myc* stimulează creşterea celulară necontrolată. Mecanismul acţiunii ei este identic cu acela al retravirusurilor oncogene netransductoare.

Vaccinuri virale

Imunitatea dobândită artificial activ, este consecinţa administrării celor mai utilizaţi imunomodulatori – *vaccinurile*.

Cele mai importante programe de imunizare au avut ca scop protecţia faţă de *variolă*, *poliomielită* şi *rujeolă*.

Un program de imunizare se bazează pe producerea unui vaccin sigur şi eficient şi pe o strategie adecvată de administrare, în funcţie de scopul urmărit.

Scopul vaccinării este *eradicarea, eliminarea* sau *limitarea* agentului patogen şi a manifestărilor patologice.

Eradicarea semnifică dispariţia agentului infecţios, consecutiv acţiunii de vaccinare.

Eliminarea are ca scop diminuarea până la dispariţie, a manifestărilor patologice, dar agentul infecţios se păstrează în populaţia umană sau animală.

Limitarea este o strategie de control a îmbolnăvirii, până la punctul la care nu mai constituie o problemă de sănătate publică.

In scopul eradicării sau eliminării, se practică vaccinarea întregii populaţii, iar pentru limitare, se imunizează selectiv persoanele sau grupele de persoane expuse celui mai mare risc de infecţie.

Vaccinurile se administrează înainte de a se produce infecţia cu tulpina salbatică a agentului patogen. Excepţia o constituie virusul rabic, al cărui vaccin se administrează după ce s-a produs o presupusă infecţie. Faptul este posibil, deoarece infecţia rabică are o perioadă lungă de incubaţie şi permite ca vaccinarea să inducă un răspuns imun eficient, care modifică evoluţia infecţiei.

Vaccinurile virale sunt de trei categorii:

1) Vaccinuri cu virus activ (infecţios) atenuat;

2) Vaccinuri cu virus inactivat (neinfecţios).

Ambele categorii sunt *vaccinuri unitare*.

3) Vaccinuri subunitare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Vaccinurile cu virus atenuat se obţin din tulpinile virale atenuate, lipsite complet sau aproape complet de patogenitate, dar îşi păstrează capacitatea de a induce un răspuns imun protector. Fiind infecţioase, ele se multiplică în organismul vaccinat şi produc o stimulare antigenică continuă, într-un interval de timp.

Vaccinarea cu virusuri atenuate conferă o imunitate de durată, după administrarea unei singure doze.

Atenuarea virusurilor se obţine pe mai multe căi.

1) *Utilizarea pentru vaccinare, a unui virus înrudit,* de la o altă gazdă. Cel mai vechi vaccin viral (Jenner, 1798), utilizat în controlul variolei, este virusul vaccinal, recoltat din leziunile pustulare de pe ugerul vacii. Virusul vaccinal imunizează încrucişat cu virusul variolei (smallpox) şi este protector faţă de infecţia variolică.

Virusul rujeolei imunizează câinele faţă de virusul bolii Carré. Anticorpii faţă de virusul rujeolei neutralizează virusul bolii Carré, dar nu şi invers.

Calea de abordare a lui Jenner, pentru obţinerea preparatelor virale utilizabile ca vaccinuri umane este folosită şi astăzi. Ea implică izolarea unor virusuri de la mamifere sau de la păsări, înrudite antigenic cu diferite virusuri umane. Pasajul lor în celulele diploide umane (CDU) *in vitro,* echivalează cu procesul atenuării. Celulele diploide umane reprezintă un substrat semipermisiv pentru virusurile umane şi mamaliene şi adeseori, multiplicarea lor este lipsită de eficienţă.

Genele virusurilor mamaliene şi aviare, care determină spectrul de gazdă au o mare diversitate a secvenţelor de nucleotide, faţă de genele corespunzătoare ale virusurilor umane. Efortul de a realiza noi vaccinuri, pe calea clasică a lui Jenner, trebuie să se sprijine pe tehnicile de genetică virală, biologie moleculară şi imunologie.

2) *Inocularea virusului patogen* sau parţial atenuat, pe o cale "nenaturală", adică alta decât cea prin care virusul pătrunde în mod obişnuit în organism. Metoda este folosită pentru vaccinarea animalelor (de exemplu, virusul laringotraheitei păsărilor, se administrează prin instilare în ochi). Pentru om, metoda nu se foloseşte, deoarece riscul infecţiei este mare.

3) *Pasajul virusului* de origine umană într-un substrat "nenatural", *in vivo* sau *in vitro.* Cele mai importante vaccinuri pentru om şi animale s-au obţinut pe această cale. Virusul se cultivă în mod repetat, prin inoculare la organisme sănătoase sau în culturi primare de celule: virusul febrei galbene s-a inoculat la şoarece şi apoi în embrionul de găină; poliovirusul s-a inoculat în celulele de rinichi de maimuţă; virusul rujeolei – în fibroblaste de embrion de găină. Pasajul într-un substrat celular "nenatural", selecţionează mutante printr-un cumul de evenimente mutaţionale întâmplătoare. In practica vaccinării, se utilizează cele cu proprietăţi adecvate de atenuare şi imunogenitate. Mutantele care după administrare rămân localizate la poarta de intrare, sunt cele mai utile. Unul din marile succese ale acestei metode de atenuare este vaccinul *polio.* Prin pasaje succesive în culturile celulare de rinichi de maimuţă, s-a selectat o linie lipsită de neurovirulenţă, după inocularea ei intracerebrală sau intraspinală, la maimuţă. Vaccinul *rubeolic* s-a obţinut prin cultivarea virusului pe acelaşi substrat, iar liniile folosite ca vaccin *rujeolic* şi al *febrei galbene* s-au cultivat pe fibroblaste de embrion de găină.

Vaccinarea cu un preparat viral atenuat echivalează cu o infecţie uşoară, asimptomatică.

Vaccinurile virale atenuate au avantajul important al stimulării ambelor compartimente ale răspunsului imun: celular şi humoral, atât sistemic cât şi local. Acest fapt este deosebit de important pentru infecţiile virale în care imunitatea mediată celular are un rol esenţial în eliminarea virusului, cât şi pentru infecţiile mucoaselor, în care atât imunitatea locală cât şi cea sistemică, sunt necesare pentru rezistenţa optimă.

Vaccinurile virale atenuate stimulează răspunsul imun faţă de fiecare din antigenele protectoare ale unui virus. Imunitatea indusă de aceste vaccinuri este mai durabilă, mai eficientă şi are un spectru mai larg de reactivitate încrucişată, decât cea indusă de virusurile inactivate. Reactivitatea încrucişată este foarte importantă pentru virusurile care suferă variaţie antigenică progresivă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virusurile atenuate din vaccinuri, păstrându-şi capacitatea de multiplicare în organismul vaccinat, se răspândesc în populaţie şi imunizează chiar indivizi nevaccinaţi.

Vaccinurile atenuate se produc cu un preţ de cost mai scăzut şi se administrează mai uşor. In cazul vaccinului polio, o singură doză administrată oral este sufcientă pentru a crea o bună stare de protecţie.

Dezavantajele vaccinurilor virale atenuate sunt legate de riscul ridicat al *contaminării* cu agenţi infecţioşi supraadăugaţi. De exemplu, loturile iniţiale de vaccin polio, au fost contaminate cu SV_{40}, din celulele de rinichi de maimuţă, dar nu s-a constatat creşterea incidenţei tumorilor la copiii vaccinaţi. Vaccinul atenuat al virusului febrei galbene, multiplicat în fibroblastele de embrion de găină, a fost contaminat iniţial cu virusul leucozei aviare.

Unele virusuri atenuate (rujeolic, rubeolic, al febrei galbene) păstrează un nivel scăzut de *virulenţă reziduală*, care determină infecţii la copiii cu imunodeficienţe.

O problemă importantă, legată de infecţiozitatea vaccinurilor atenuate, este aceea a *restaurării* unui grad variabil de virulenţă după vaccinare, care determină infecţii cu manifestări clinice la copiii imunodeficienţi. Procesul infecţios nu este consecinţa alterării genetice a virusului din vaccin. Din această cauză, vaccinul nu se administrează gravidelor.

Vaccinurile atenuate ridică problema *instabilităţii genetice*. Virusul rujeolic atenuat este labil, în special la variaţiile termice şi de aceea necesită un regim termic constant (+4°), pe toată durata depozitării.

Un alt dezavantaj constă în faptul că virusul atenuat poate să producă o infecţie persistentă. Deasemenea, administrarea vaccinului atenuat poate să *interfere* cu virusul de tip sălbatic care infectează natural şi să domine până la anulare eficienţa vaccinării. De exemplu, virusul polio atenuat, se administrează pe cale orală, dar poate să interfere cu o largă varietate de enterovirusuri.

Vaccinurile inactivate conţin virioni care, după tratamentul cu agentul chimic inactivant nu pot să iniţieze ciclul de multiplicare în substratul permisiv.

Preparatul viral brut se obţine prin cultivarea virusului într-un substrat permisiv: în oul embrionat de găină (virusul influenza), în culturi celulare de rinichi de maimuţă (virusul polio), sau în fibroblastele umane de embrion de găină (polio, rujeolic, rabic). Preparatul brut se inactivează cu formol, acetil-etilenimina sau cu beta-propiolactona.

Preparatele virale inactivate, utilizabile ca vaccin au *avantajul* riscului minim al infecţiei. Rareori, preparatele inactivate conţin virus infecţios rezidual, care a rezistat tratamentului de inactivare, sau care provine din contaminarea cu un alt virus.

Vaccinurile virale inactivate au câteva dezavantaje. Uneori, tratamentul cu un agent chimic *anulează imunogenitatea* unor proteine virale, astfel încât răspunsul imun faţă de virusul inactivat nu este protector. De exemplu, inactivarea cu formol a virusului rujeolic anulează imunogenitatea proteinei de fuziune (F), astfel încât vaccinul îşi pierde proprietatea protectoare.

Vaccinurile inactivate *nu stimulează imunitatea mediată celular* (mediată de limfocitele Tc), care au rol decisiv în eliminarea celulelor infectate cu virus şi în rezistenţa la infecţiile cu o gamă largă de virusuri.

Preţul de cost al vaccinurilor inactivate este mai mare.

Preparatele virale inactivate, folosite ca vaccinuri, se obţin din virusul rabic cultivat în CDU şi în embrionul de raţă, din virusul oreionului şi din virusul influenza, cultivate în embrionul de găină, din virusul polio, cultivat în celulele de rinichi de maimuţă. Toate sunt inactivate cu beta-propiolactonă sau cu formol.

Preparatul inactivat al virusului hepatitei B este o realizare recentă, dar este foarte costisitor pentru că virusul nu se cultivă în sisteme celulare *in vitro*, iar tehnicile de purificare a virusului din serul pacienţilor infectaţi cronic sunt foarte laborioase.

Vaccinuri subunitare

Iniţial, vaccinurile s-au obţinut din preparatele brute de virus, după multiplicarea lor într-un ţesut (*in vivo*) sau în culturi celulare. Pe măsură ce a fost posibilă obţinerea unor titruri înalte de virus, în scopul diminuării toxicităţii vaccinului s-a trecut la purificarea virusului şi a unor componente virale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Vaccinurile subunitare conţin *proteine virale* în care se găsesc localizate situsuri antigenice majore şi care se pot substitui virionilor în practica vaccinării. De exemplu, pentru virusul influenza, vaccinul subunitar conţine antigenele de suprafaţă HA şi NA. Preparatul este mai puţin toxic decât virusul integral inactivat, dar este mai puţin eficient în stimularea răspunsului imun.

Celulele mamaliene reprezintă un sistem optim pentru producerea proteinelor virale, utilizabile ca vaccinuri subunitare. Celulele în cultură se infectează cu virus şi din lizatele celulare se purifică antigene proteice. In lizate se găseşte o cantitate mare de proteine virale în exces, neîncorporate în virioni.

Obţinerea vaccinurilor subunitare proteice, în culturile de celule animale ridică probleme dificile de purificare a proteinelor virale, din amestecul cu proteinele celulare. Dacă se folosesc linii celulare continue, trebuie îndepărtat ADN celular, potenţial oncogen.

Tehnici moderne de obţinere a vaccinurilor subunitare

Dezvoltarea biologiei moleculare şi cunoaşterea mecanismelor răspunsului imun, a stimulat preocupările privind obţinerea unor vaccinuri noi. Utilizarea anticorpilor monoclonali a făcut posibilă identificarea epitopior cu rol esenţial în stimularea răspunsului imun, iar genele codificatoare ale antigenelor, au fost clonate prin tehnicile de inginerie genică.

Genele codificatoare ale antigenelor protectoare, se pot izola după fragmentarea genomului sub acţiunea catalitică a *enzimelor de restricţie*. Prin tehnologia ADN recombinant, genele se inseră în celula procariotă (*E. coli, B. subtilis*), sau în celulele eucariote (levuri, celule mamaliene).

Fragmentarea genomului cu endonucleaze de restricţie este posibilă numai pentru dezoxiribovirusuri. Genomul ARN trebuie mai întâi transcris în ADNc şi ulterior poate fi utilizat în tehnicile de ADN recombinant. Genomul ARN de polaritate pozitivă este adecvat scopului clonării, dar nu a fost clonat ADNc al unei catene de ARN de polaritate negativă.

Genele de mamifere reprezintă substratul optim pentru clonarea genelor şi pentru producerea proteinelor virale, deoarece plierea, transportul celular şi prelucrarea proteinelor sunt asemănătoare celor ce au loc în celula infectată de virusul natural. Celulele produc cantităţi mari de antigen viral, codificate de gena clonată.

Tehnicile de clonare genică se folosesc pentru sinteza proteinelor unor virusuri, care nu se multiplică *in vitro* în sistemele celulare uzuale. De exemplu, gena pentru sinteza antigenului HBs a fost inserată într-o plasmidă şi clonată de levuri. Proteina virală este neglicozilată, dar este imunogenă pentru om şi induce sinteza anticorpilor protectori faţă infecţia naturală. S-au clonat genele codificatoare ale glicoproteinelor de HSV, VEB, HIV, VRS (virusul respirator sincitial).

Pentru purificarea glicoproteinelor virale din celulele infectate în care a fost clonată gena, s-a folosit *tehnica cromatografiei de afinitate cu anticorpi monoclonali* sau alte tehnici de separare (cromatografia cu lectine, tehnici de separare fizică).

ADN viral este funcţional chiar în celula procariotă, după transferul prin intermediul unui vector (plasmidă sau fag). Astfel s-au sintetizat antigene de poliovirus, antigenul HBs, antigenul virusului hepatitei A, HA şi NA ale virusului gripal.

O variantă a tehnicilor de ADN recombinant este aceea de obţinere a vaccinurilor cu *virusul vaccinal hibrid*. Genomul poxvirusurilor codifică circa 200 de proteine. Unele sunt esenţiale pentru multiplicarea virală, dar un interes deosebit prezintă genele neesenţiale pentru ciclul de multiplicare. Ele reprezintă circa 30% din genom şi sunt grupate la extremităţile genomului ADN dublu catenar linear. In plus, genomul este împachetat lax în virion. Aceste particularităţi au permis obţinerea, prin tehnicile de inginerie genică, a *poxvirusurilor recombinate*, infecţioase, capabile să exprime genele străine inserate în genomul lor.

ADN viral este inserat în genomul virusului vaccinal prin recombinare la situsuri omologe. Virusul vccinal hibrid se multiplică în celulele permisive şi genele inserate în genomul său codifică antigenul HBs, antigenul rabic, antigenul HSV etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Vaccinurile virale hibride sunt stabile şi stimulează ambele compartimente ale răspunsului imun.

O altă cale de producere a vaccinurilor virale atenuate, genetic stabile implică obţinerea *mutantelor de deleţie*. Mutantele prin deleţie au o capacitate diminuată de multiplicare, ceea ce *echivalează cu atenuarea*. Astfel de mutante trebuie să-şi păstreze infecţiozitatea şi imunogenitatea şi să fie stabile genetic.

Antigene peptidice sintetice. Producerea şi utilizarea antigenelor sintetice s-a impus după demonstrarea bazelor moleculare ale imunogenităţii şi după studiile privind proprietăţile imunogene ale antigenelor artificiale. Pe de altă parte, s-a demonstrat că macromoleculele proteice sau glicoproteice din structura virusurilor şi a microorganismelor infecţioase au un număr mare de determinanţi antigenici, dar numai un număr limitat dintre aceştia au semnificaţie imunogenă şi un număr foarte mic sunt inductori ai răspunsului imun protector.

Sinteza artificială a peptidelor, a devenit posibilă după introducerea metodelor de secvenţiere a ADN. Cunoaşterea secvenţei bazelor a permis dirijarea secvenţei de aminoacizi a proteinelor cu activitate biologică.

Vaccinurile sintetice conţin secvenţe polipeptidice sintetizate pe cale chimică. Ele includ determinanţi antigenici esenţiali pentru inducerea unui răspuns imun protector faţă de agenţii patogeni corespunzători.

Condiţia esenţială pentru obţinerea vaccinurilor sintetice este cunoaşterea structurii chimice a determinanţilor antigenici nativi ai virusului (sau ai microorganismelor patogene) şi identificarea regiunilor imunodominante ale moleculei.

Tehnicile de cristalografie cu raze X, cromatografia în faza lichidă, au permis identificarea situsurilor antigenice majore ale unor virusuri foarte importante pentru clinică. De exemplu, s-a determinat structura tridimensională a hemaglutininei virusului gripal şi s-au identificat *regiunile calde ale moleculei*, care, cu mare probabilitate corespnd determinanţilor antigenici. S-a stabilit secvenţa aminoacizilor, care a fost reprodusă în proteinele sintetizate artificial.

Marea majoritate a peptidelor sintetice sunt secvenţe scurte, lineare de aminoacizi, care reproduc un fragment din structura primară a moleculei proteice. Dezavantajul major este că secvenţele sintetice nu reproduc configuraţia spaţială a determinanţilor antigenici naturali, în special a celor discontinui. Aceştia sunt alcătuiţi din resturi de aminoacizi neadiacenţi în structura primară a moleculei, dar pot fi juxtapuşi în structura tridimensională a proteinei pliate. Astfel se explică slaba imunogenitate a peptidelor sintetice. Ameliorarea calităţilor de imunogenitate a peptidelor sintetice, utilizabile ca vaccinuri, depinde de gradul de asemănare a conformaţiei lor cu determinantul antigenic nativ.

Dimensiunile mici ale peptidelor sintetice impun cuplarea lor cu o moleculă purtător, pentru creşterea gradului de imunogenitate. S-a folosit hemocianina de *Megathura* (KHL), cuplată prin intermediul glutaraldehidei sau a unei grupări tiol a unui rest de cisteină, adăugat la o extremitate a secvenţei sintetice.

S-au sintetizat peptide care reproduc secvenţe de aminoacizi ale unor polipeptide ale virusului hepatitei B, cu diferite eficienţe imunoprotectoare, precum şi peptide care reproduc unele secvenţe ale hemaglutininei virusului gripal.

Polipeptidele sintetice utilizate ca vaccinuri, au avantajul că nu conţin alte componente care ar putea produce efecte secundare şi stimulează răspunsul imun strict specific faţă de epitopii antigenici critici ai agentului infecţios. Sunt stabile indefinit şi se produc la un preţ de cost scăzut. Au însă dezavantajul major de a nu stimula răspunsul imun mediat celular.

Virusuri cu genom defectiv

Dependenţa totală de substratul celular pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare, este o reflectare a simplificării organizării genetice şi are semnificaţia caracterului defectiv global al genomului viral.

Un virus cu genom defectiv se caracterizează prin absenţa uneia sau mai multor gene esenţiale pentru multiplicarea sa. Din această cauză, virusurile defective necesită, pentru

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

replicarea lor, activitatea *helper* (*to help*, engl. = a ajuta), a uneia sau mai multor gene ale unui alt genom viral.

Genomurile virale defective aparţin următoarelor categorii de entităţi infecţioase:

1) *Genomuri virale defective interferente* apar la majoritatea virusurilor cu genom ARN sau ADN. Caracteristica lor comună este absenţa unui set de gene esenţiale ale ciclului de multiplicare. Genomul viral defectiv se împachetează în proteinele capsidei, dar necesită un *virus helper omolog*, pentru multiplicarea sa. In ciclul de multiplicare, virionii defectivi interferă cu virusul helper omolog.

2) *Genomurile virale defective integrate* sunt caracteristice bacteriofagilor lizogeni. Aceste virusuri pot transfera gene prin fenomenul transducţiei specializate sau generalizate. Cel mai cunoscut este *fagul lambda*, în interacţiunea sa lizogenă cu *E. coli*. Caracterul defectiv al fagului λ derivă din faptul că genomul viral integrat, în momentul exciziei, pierde o secvenţă de material genetic, echivalentă cu gena pe care o transduce. Există dovada că genomurile fagice defective integrate sunt larg răspândite în celulele bacteriene şi acestea au influenţat evoluţia celulei gazdă.

Fagii defectivi pot fi uşor induşi la numeroase specii bacteriene prin tratament cu mitomicina C, radiaţii UV sau cu alţi agenţi care induc desfăşurarea ciclului litic al fagilor temperaţi ai bacteriilor lizogene. Rezultă particule neinfecţioase, care din punct de vedere morfologic, nu se disting de fagi, sau numai subunităţi fagice: capete goale, capete pline, teci, cozi. Uneori, particulele induse, au activităţi de bacteriocine şi determină liza celulelor sensibile.

3) *Virusurile satelite şi moleculele de ARN satelite*. Pentru ciclul lor de multiplicare, virusurile satelite necesită produsele genice ale altor virusuri neînrudite.

a) *Virusurile asociate adenovirusurilor (AAV)*. Genomul lor este o moleculă de ADN monocatenar, ce codifică două proteine capsidale. Virusurile adeno-asociate se pot multiplica numai în nucleul unei celule, infectată simultan cu un adenovirus care are rolul de helper. Multiplicarea virusurilor adeno-asociate, interferă cu ciclul de multiplicare a virusurilor helper şi cu procesul transformării celulare.

b) *Virusul hepatitei D* (*HDV*) este clasificat ca un virus satelit, deoarece în ciclul multiplicării sale, HBV este un helper esenţial. Din această cauză, infecţia cu virusul hepatitei D este asociată, în mod obligatoriu cu virusul hepatitei B şi cu antigenul HBs.

Genomul virusului hepatitei D, este o moleculă de ARN monocatenar, circulară, covalent închisă, formată din 1679-1683 de baze. Molecula se pliază şi bazele complementare se împerechează în proporţie de 70%, formând o structură de formă alungită neramificată. O secvenţă genomică de 85 nucleotide, funcţionează ca o enzimă de autoclivaj (ARN are funcţie *ribozimică*).

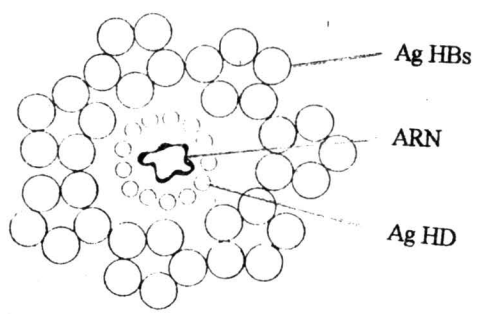


Fig. 194. Alcătuirea virusului hepatitei delta.

Proteine codificate de virus. Hepatocitele conţin ARN genomic şi antigenomic, raportul molecular fiind de 10/1. Ambele tipuri de molecule ARN au mai multe cadre de citire. Antigenul specific hepatitei delta (HD) este codificat de ARN antigenomic. Catenele antigenomice au, probabil, rolul de matriţe pentru sinteza ARN genomic.

În serul pacienţilor infectaţi cu HDV, se găsesc două tipuri de antigene: de 24 kD şi de 27 kD. Cele două tipuri de molecule sunt foarte asemănătoare şi se găsesc şi în mojaratul de ţesut hepatic. Ele au 195 şi 214 aminoacizi. Cei 195 aminoacizi sunt aceiaşi pentru ambele variante moleculare.

Replicarea HDV. Virusul hepatitei D nu a fost cultivat nici în liniile celulare hepatice care conţin ADN al virusului hepatitei B, în stare integrată. Aceste linii nu pot fi infectate nici cu virusul hepatitei B. Faptul reflectă, probabil, pierderea receptorilor de suprafaţă ai celulei. Virusul hepatitei D are un tropism strict pentru hepatocit.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

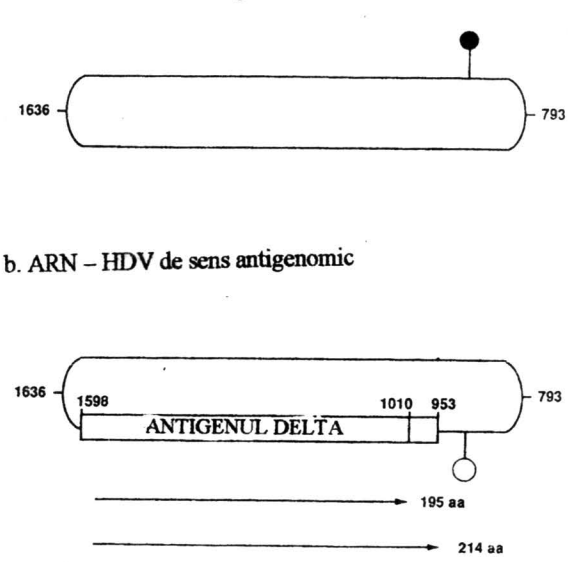


Fig. 195. ARN genomic și antigenomic al virusului hepatitei delta. ARN circular este reprezentat sub forma unei baghete, cu extremitățile la nucleotidele 793 și 1636. a. ARN de sens genomic, cu situsul de clivare între nucleotidele 685 și 686 (cercul plin). b. Situsul de autoclivare pe molecula de ARN cu sens antigenomic este localizată între nucleotidele 900 și 901 (cercul gol). Regiunea codificatoare a antigenului delta este localizată între nucleotidele 1598-1010, pentru varianta S (Small) și între nucleotidele 1598-953, pentru varianta L (Large) (după Polish, 1993).

Virionii hepatitei D ce se găsesc în ser, conțin o moleculă de ARN genomic de 1,7 kb, cu polaritate genomică sau antigenomică. In celulele infectate se găsesc nu numai genomuri HDV, ci și copii complementare (antigenomice). ARN antigenomic codifică antigenul delta, de 195 aminoacizi. Moleculele de ARN antigenomic, ca și ARN genomic sunt localizate în nucleu și nu sunt traduse, deoarece conformația circulară este incompatibilă cu traducerea. Sinteza antigenului delta este dependentă de ARN poliadenilat, citoplasmatic, cu secvența antigenomică, considerat ca ARNm pentru antigenul delta.

În timpul replicării genomului, o fracție a copiilor de ARN antigenomic, suferă unul sau mai multe evenimente de "editing" post-transcriere. Unul dintre ele este esențial: adenozina din mijlocul codonului terminal *amber* al ARN codificator al antigenului delta de 195 aminoacizi, este dezaminată de o enzimă a celulei. După modificări succesive, codonul terminal *amber* este înlocuit cu unul pentru sinteza triptofanului. ARNm modificat, codifică o proteină mai mare – antigenul delta de 214 aminoacizi. Antigenul D este o proteină bazică, fosforilată și se acumulează în nucleul celulei infectate.

Antigenul mic (195 aminoacizi) este necesar pentru replicarea genomului. Molecula mare este sintetizată mai târziu în infecție, nu favorizează replicarea genomului (este un inhibitor al replicării), dar este esențial pentru asamblarea particulei de HDV. Antigenul mare ușurează interacția HDV cu proteinele de înveliș ale HBV, dar este și un represor al multiplicării HDV. Dacă sinteza proteică nu se comută de la varianta mică la varianta mare, infecția acută poate să progreseze la o hepatită fulminantă.

În infecțiile experimentale, HDV inhibă replicarea HBV: diminuă viremia cu HBV, diminuă replicarea ADN de HBV, precum și HBc și HBs.

Mecanismul interferenței, produsă de HDV, asupra multiplicării HBV nu se cunoaște. Singura funcție helper recunoscută pentru HBV este conferirea proteinei de înveliș (Ag HBs), dar acestea, chiar în infecția dublă, nu sunt complet utilizate. O posibilă explicație este stimularea hepatică a sintezei interferonului, cu rol inhibitor asupra multiplicării HBV.

Replicarea genomului. În celulele hepatice ale animalelor infectate experimental (cimpanzeu, marmotă), se găsesc molecule de ARN de diferite dimensiuni, cu polaritate genomică și antigenomică. Moleculele antigenomice sunt secvențe multiple complementare genomului. Majoritatea moleculelor genomice sunt monocatenare, iar cele antigenomice sunt complexate cu catene genomice, datorită complementarității bazelor perechi.

Variantele moleculare de ARN găsite în nucleul hepatocitelor (ARN genomic circular, ARN cu polaritate genomică, linear multimeric, ARN linear dublu catenar multimeric), sugerează că replicarea genomului HDV se face după modelul cercului rotativ.

Moleculele circulare cu polaritate genomică, au rol de matriță pentru sinteza moleculelor multimere, lineare, complementare, iar acestea la rândul lor, sunt copiate în molecule multimere lineare de polaritate genomică. Acestea sunt clivate la situsuri specifice și rezultă molecule monomere lineare. Extremitățile lor sunt ligaturate și se formează molecule circulare închise covalent.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Copierea matriței genomice, dar și a catenei lineare multimere antigenomice este catalizată, după toate probabilitățile, de ARN-polimeraza II a celulei, care "greșește" matrița ei naturală (molecula de ADN).

Pentru a funcționa ca matriță, molecula circulară de ARN trebuie clivată la un situs de inițiere a transcrierii. Aceste clivări și ligaturări se produc în absența proteinelor enzimatice, care clivează moleculele de ARN, excizează intronii și reunesc exonii. Funcțiile enzimatice de clivare și ligaturare sunt realizate de însăși molecula de ARN, care are activitate enzimatică ribozimică.

4) *Pseudovirionii* sunt particule virale care încorporează și conțin în capsida lor, numai secvențe genomice ale celulei gazdă. Acestea înlocuiesc complet secvențele genomice virale. Din categoria pseudovirionilor fac parte fagii care realizează transducție generalizată. De exemplu, fagul P_{22}, infecțios pentru *Salmonella* nu produce degradarea ADN celular, ci numai fragmentarea sa. In capsidele fagice sunt încorporate de regulă, numai gene de proveniență bacteriană și în mod excepțional, gene celulare în asociație cu mici fragmente de genom viral.

Fagii de transducție generalizată, au o importanță deosebită pentru fluxul genetic la procariote.

5) *Virusurile condiționat defective* conțin genomuri mutante, care sunt defective numai în anumite condiții. Cele mai importante pentru studiile de genetică virală, sunt mutantele termosensibile (ts) și cele ale spectrului de gazdă.

Agenți infecțioși subvirali

Ideia ca virusurile ar reprezenta cel mai simplu și mai rudimentar tip de agenți infectioși a fost infirmată de evidențierea în ultimele decenii, a unor agenți subvirali, patogeni pentru plante, om și animale, care produc boli grave, mortalitate și mari pagube economice.

Viroizii

Viroizii reprezintă o categorie specifică de agenți infectioși subvirali, patogeni exclusiv pentru plante, caracterizați printr-un genom alcătuit din ARN pur, prin absența capsidei proteice și a stadiului de virion.

Denumirea de "viroid" (cu aspect de virus) este neadecvată, deoarece genomul lor nu este niciodată protejat de un înveliș proteic.

Viroizii s-au descoperit accidental (Diener, 1971), cu ocazia încercărilor de caracterizare a agentului patogen al bolii tuberculilor fusiformi la cartof, considerată până atunci ca fiind de origine virală. Viroizii cunoscuți în prezent, au luat numele maladiei pe care o produc: *viroidul tuberculilor fusiformi la cartof, al nanismului și marmorării clorotice a crizantemelor, al nanismului la hamei* etc. Cel mai studiat este viroidul care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof.

Morfologie și structură moleculară. Viroizii sunt molecule de ARN pur. La microscopul electronic, ei apar sub forma unor structuri lineare, ca niște bastonașe, ușor curbate, lungi de circa 50 nm, cu o grosime de 2,0 – 2,5 nm, izolate sau grupate în agregate compacte. Greutatea lor moleculară este cuprinsă între 75 – 125 kD.

Structura moleculară a viroidului care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof, este cu totul neobișnuită, fiind reprezentată de molecule de ARN mononatenar, circulare, închise covalent, alcătuite din 359 ribonucleotide, a căror structură primară (secvență) a fost determinată cu exactitate.

Structura secundară, de dublă helice defectivă, este deasemenea foarte caracteristică. Datorită gradului ridicat de complementaritate intramoleculară, un număr mare de baze (244, respectiv 68%) sunt legate în perechi. Ele formează regiuni dublu catenare (rezultate din împerecherea intracatenară a unei secvențe de 4-5 baze, care alternează cu regiuni mai scurte monocatenare (2-3 baze), sub forma unor bucle interne și terminale, corespunzătoare regiunilor lipsite de baze complementare, care rămân separate. Acest tip de structură, numită "în ac de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

păr", impune anumite constrângeri topologice, datorită cărora molecula de ARN suferă o pliere tridimensională. După denaturare cu formaldehidă, la 63°, legăturile de H dintre bazele complementare se rup şi la microscopul electronic se observă molecule circulare monocatenare cu lungimea de 140 μm şi molecule lineare monocatenare cu lungimea medie de 110 nm.

Datorită dimensiunilor mici, viroizii au rezistenţă deosebită la agenţii fizici (radiaţii) şi chimici.

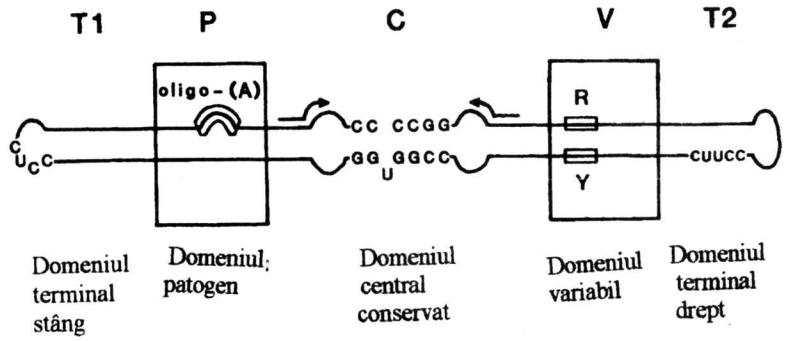


Fig. 196. Domeniile genomului viroidului cartofului. Săgeţile indică secvenţele repetate invers. R, Y semnifică scurte regiuni helicale .

Mecanismul replicării ARN viroidal nu este cunoscut. Cantitatea de informaţie genetică a ARN viroidal este foarte mică (teoretic suficientă numai pentru a codifica o proteină alcătuită din 119 aminoacizi). După cum s-a demonstrat în experienţele cu extracte acelulare de plante şi bacterii, ARN viroidal este lipsit de capacitate de codificare, datorită absenţei situsurilor de legare ribosomală (absenţa codonului initiator AUG) şi datorită structurii secundare stabile şi circularităţii moleculei. ARN viroidal nu funcţionează ca ARNm. Absenţa capacităţii de codificare a ARN viroidal este confirmată de faptul că din celulele vegetale infectate nu s-a purificat nici o proteină străină de proteinele plantei, care să sugereze originea viroidală.

Replicarea viroizilor este, în consecinţă, total dependentă de celulă, reprezentând o formă aparte de parazitism absolut, distinctă de tipul celei descrise pentru virusuri.

Au fost propuse mai multe modele ipotetice, bazate pe cunoştiinţele actuale de biologie moleculară, implicând activitatea unor enzime diferite.

Modelul lui Branch şi Robertson (1984) este cel mai probabil, deoarece se bazează pe evidenţierea concomitentă, în celulele infectate, a două tipuri de molecule de ARN, respectiv, molecule tipice de ARN viroidal circulare (notate conventional "+") şi molecule de ARN multimere lineare, cu o secvenţă complementară (notate "—").

Modelul consideră că moleculele multimere de ARNc sunt intermediari de replicare, iar forma circulară a viroizilor maturi, sugerează că replicarea s-ar face după modelul "cercului rotativ", sub controlul ARN-polimerazei II celulare, a cărei legare de extremităţile viroizilor a fost evidenţiată prin microscopie electronică. Moleculele multimere de sens antigenomic sunt transcrise în molecule multimere complementare de sens genomic. Acestea sunt prelucrate prin clivaj la situs specific şi după legarea extremităţilor se formează molecule circulare mature. In mod surprinzător, aceste activităţi de clivare şi legare a extremităţilor, se desfăşoară în absenţa proteinelor enzimatice şi se aseamănă cu mecanismul autoexciziei intronilor. ARN are activitate enzimatică – *ribozimică*.

Deoarece, în mod normal, ARN-polimeraza II celulară foloseşte ca matriţă o moleculă de ADN, Branch şi Robertson consideră că, datorită structurii lor unice, prezenţa viroizilor în celule ar fi interpretată greşit de enzimă, ca o moleculă de ADN. După aceşti autori, viroizii ar fi agenţi similari ADN (ADN-like).

După alţi autori, replicarea moleculei de ARN viroidal este *autocatalitică*. O moleculă de ARN care se replică autocatalitic se numeşte *ARN-replicază*.

Replicarea viroizilor are loc în nucleul celulelor şi, ca urmare, infecţiozitatea maximă este asociată cu nucleul şi, în special, cu cromatina celulelor infectate.

În funcţie de faza infecţiei, numărul viroizilor variază între 200 şi 10 000/celulă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

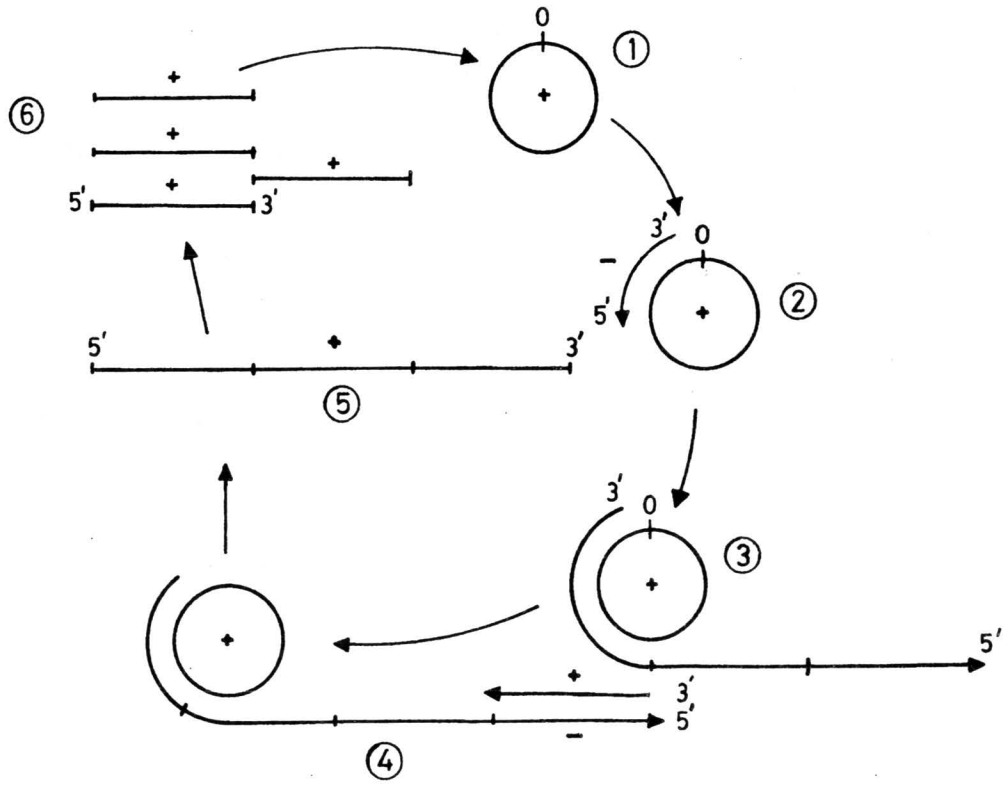


Fig. 197. Replicarea viroizilor după modelul lui Branch şi Robertson (1984). Viroidul matur (+) (1) are rol de matriţă (2) pentru sinteza unor molecule multimere de ARN complementar (3). Acestea sunt transcrise în molecule multimere (+) (4), reprezentate de genomuri viroidale concatemere (5). Clivarea lor riguroasă (6) are ca rezultat formarea moleculelor monomere de ARN viroidal, cu secvenţe terminale caracteristice. Circularizarea lor generează ARN viroidal progen.

Patogenitatea viroizilor

Deşi cantitatea de informaţie genetică pe care o aduc în celulă este foarte mică, viroizii produc mai mult de 10 maladii grave ale plantelor de cultură sau ornamentale, cu importanţă economică. Intre acestea, cele mai studiate sunt: boala tuberculilor fusiformi la cartof, nanismul şi marmorarea clorotică a crizantemelor, nanismul hameiului, boala cadang-cadang a cocotierului şi o boală caracteristică a portocalilor şi lămâilor, însoţită de distrugerea progresivă a scoarţei şi scăderea masivă a producţiei de fructe.

Infecţia experimentală reproduce tabloul manifestărilor patologice la plante din aceiaşi specie, datorită replicării excesive a acestor entităţi moleculare cu caracter infecţios. ARN viroidal care produce boala tuberculilor fusiformi la cartof, se propagă la un număr foarte mare de plante din familia *Solanaceae*, dar şi la plante din alte familii, unde se replică fără să producă simptomele îmbolnăvirii.

Viroizii produc infecţii persistente: la cartof, simptomele apar în perioada formării tuberculilor, iar la tomate, la 2-3 săptămâni de la infecţie. In frunzele de tomate şi în peţiol, după infecţia cu ARN viroidal al tuberculilor fusiformi de cartof se produce o hipertrofie marcată a nucleului. Se intensifică curenţii citoplasmatici. In ţesutul infectat, infecţiozitatea este asociată cu fracţia sa nucleară, ceea ce denotă că ARN viroidal este asociat cu nucleul şi în special cu cromatina celulelor infectate.

Mecanismul producerii bolilor viroidale este greu explicabil, deoarece ARN viroidal nu codifică sinteza unor proteine noi. Ţesuturile plantelor infectate nu conţin proteine noi, în raport cu plantele sănătoase, dar prezintă variaţii cantitative foarte importante ale unor proteine normale. Este probabil că viroizii determină o perturbare a mecanismelor de reglare a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

exprimării anumitor gene ale celulei. Viroizii nu ar acţiona prin exprimarea propriei lor informaţii genetice, ci prin perturbarea funcţiei genelor celulare, a cărei consecinţă ar fi alterarea mecanismelor normale de reglare a funcţiilor celulei.

In unele cazuri, s-a observat o scădere pronunţată a cantităţii de gibereline în ţesuturile plantelor infectate. Deoarece acidul giberelic poate regla evenimentele nucleare ale transcrierii, precum şi metabolismul unor specii de ARN, replicarea viroizilor şi/sau patogenitatea lor ar putea fi influenţate prin intermediul acestei clase de mediatori hormonali.

Tulburările de creştere, frecvent asociate cu infecţiile viroidale, pot fi astfel explicate ca rezultat al unui dezechilibru al sintezei şi activităţii hormonilor de creştere: viroizii prezenţi în nucleul celulelor, ar acţiona ca molecule anormale de reglare, care interferă cu cele care asigură în mod normal reglarea genelor ce codifică hormonii de creştere.

Transmiterea viroizilor pe orizontală, de la o plantă bolnavă, la plantele sănătoase se realizează în mod obişnuit, pe cale mecanică (de exemplu, prin altoire sau prin alte leziuni mecanice), probabil prin intermediul nucleilor celulari sau al unor fragmente de cromatină, care conţin ADN viroidal. Conservarea infecţiozităţii viroizilor în cursul transmiterii, în fazele extracelulare, adică păstrarea infecţioziăţtii lor în absenţa învelişului proteic (capsidal) este datorată localizării lor intranucleare, la adăpost de atacul enzimatic.

Transmiterea viroizilor pe verticală, se face prin polenul plantelor infectate, de tomate sau de cartof.

Originea viroizilor este necunoscută. Au fost propuse mai multe ipoteze.

1. *Ipoteza originii virale* a fost formulată în două variante:

a) Viroizii ar fi entităţi virale foarte primitive, care nu au ajuns la gradul de complexitate structurală şi genetică, necesare pentru a induce în celulă, reacţiile metabolice noi, de biosinteză, pentru a codifica sinteza proteinelor specifice, capabile să asigure propria lor replicare;

b) Viroizii ar reprezenta entităţi virale degenerate, a căror biosinteză şi replicare a fost iniţial determinată de infecţia cu ARN viral, care a suferit o reducere importantă a genomului (inclusiv a genelor care codifică proteinele capsidei) şi a căpătat o autonomie totală.

2. *Ipoteza originii celulare* consideră viroizii ca provenind din acizii nucleici ai celulei:

a) Viroizii ar putea proveni din *transcrierea unor gene cromosomale* patologice, sub influenţa unor factori încă nedeterminaţi, sau ar fi derivaţi dintr-o specie de ARN cu greutate moleculară mică, de genul celor prezente în nucleu şi nucleol, implicate în mod normal în reglarea unor funcţii nucleare şi în transcrierea ARN;

b) *Viroizii ca derivaţi ai elementelor genetice transpozabile (EGT)*. Ipoteza se bazează pe observaţia că viroizii conţin secvente care se aseamănă cu cele prezente la extremităţile EGT. Viroizii ar fi evoluat din EGT sau din provirusuri retravirale, din care, în cursul transcrierii la ARN, ar fi dispărut unele secevenţe de baze;

c) Ipoteza originii viroizilor prin *circularizarea intronilor*, se bazează pe faptul că genele celulelor eucariote, ca şi cele ale virusurilor animale, au o structură discontinuă, în sensul că sunt formate din secvenţe cu rol de codificare (exoni), care prin transcriere sunt regăsite în structura ARN matur şi secvenţe intercalate (introni), care sunt clivate în etapa de prelucrare a ARN premesager.

In cursul procesului de biosinteză a proteinelor, întreaga genă (exonii şi intronii) este transcrisă la o moleculă mare de ARN premesager. Ulterior, acesta suferă un proces de maturare, prin care intronii sunt îndepărtaţi de o enzimă specială, iar exonii sunt "lipiţi" sau înăditi cap la cap, pentru a forma o moleculă de ARN matur, care trece în citoplasmă şi este tradusă într-o secvenţă polipeptidică.

Secţionarea intronilor este controlată de o moleculă mică de ARN (ARN U_1), prezentă în nucleii celulelor vegetale, parţial omolog cu intronii, care se leagă de extremităţile acestora, asigurând excizia corectă. Final, intronii se circularizează sub controlul unei ARN-ligaze. Circularizarea împiedică degradarea enzimatică, conferă posibilitatea de replicare necontrolată şi de infectiozitate, prin mobilitate intercelulară şi între organisme.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Virusoizii

Virusoizii sunt molecule mici de ARN satelite, descoperite relativ recent (1983) şi sunt foarte puţin studiaţi.

Virusoizii sunt molecule mici de ARN monocatenar, circulare, covalent închise, incluse în *stare fizic autonomă* (ARN_2), în capsida unor virusuri fitopatogene cu genom linear segmentat sau *integrate în genomul viral* (ARN_1).

Virusoizii sunt alcătuiţi din molecule mici de ARN monocatenare, circulare, închise covalent (ARN_2), de 300-400 nucleotide, prezente uneori în forme concatemere, în celulele plantelor infectate. Replicarea moleculei de ARN genomic este catalizată de ARN-polimeraza virusului helper sau de ARN-polimeraza dependentă de ARN a celulei vegetale. Sediul replicării este citoplasma celulei vegetale. Activitatea ARN-polimerazei dependentă de ARN este detectabilă în multe tipuri de celule vegetale neinfectate, se intensifică după infecţia virală şi nu are specifitate de virus, în timp ce ARN-polimerazele virale sunt specifice. Virusoizii nu se multiplică în absenţa virusului helper, fie datorită absenţei replicazei, fie datorită absenţei proteinelor capsidale.

In cazul VTMV (*Velvet tobacco mottle virus*), care produce o formă specială de marmorare la plantele de tutun, ca şi în cazul celui care produce marmorarea unor plante tropicale (*Solanum nodiflorum mottled virus*), virusoizii sunt integraţi în genomul viral, prezenţa lor asociată fiind obligatorie pentru producerea infecţiei.

Prin contrast, în cazul LTSV (*Lucerne transient strek virus*), ARN_2 virusoidal se comportă ca ARN satelit, nefiind implicat în replicare.

Virusoizii se aseamănă cu *viroizii,* prin structura lor secundară (dar probabil mai flexibilă), prin aparenta incapacitate de a codifica sinteza unor proteine şi prin mecanismele de replicare.

Virusoizii se deosebesc de viroizi, prin faptul că genomul lor este încapsidat şi este incapabil să infecteze plantele sensibile, în absenţa genomului viral asociat.

Virino

Sub această denumire a fost descris un agent infecţios subviral, alcătuit dintr-o moleculă mică de acid nucleic, asociat cu o proteină codificată de celula gazdă. Acidul nucleic nu codifică sinteza unor proteine, dar are rol de matriţă pentru propria sa replicare, catalizată de enzimele celulei gazdă. El are, probabil, un rol de reglare a activităţii celulelor infectate, declanşând sinteza unor proteine codificate de celula gazdă.

Prionii

Prionii formează o categorie specifică de agenţi infectioşi subvirali, patogeni pentru om şi animale, alcătuiţi exclusiv dintr-o moleculă proteică. Ei sunt lipsiţi de genom şi, în consecinţă diferă de toate celelalte categorii de agenţi infectioşi prezenţi în natură, prin faptul că nu conţin nici-un tip de acid nucleic (nici ADN, nici ARN).

Conceptul de *prion* (*p*roteinaceous *i*nfectious) a fost definit de Prusiner (1982), după circa 20 de ani de studii asupra bolii *scrapie*. Denumirea reflectă unul din simptomele sale majore, respectiv pruritul (*to scrapie*, englez = a freca, a răzui, a curăţi răzuind lâna).

Prionii sunt alcătuiţi dintr-o *glicoproteină hidrofobă*, cu greutatea moleculară de 28 kD, extrem de rezistentă la degradarea cu proteaze, la formol 10% (timp de 28 de luni) şi la căldură (fierbere timp de trei ore), precum şi la toţi agenţii inactivatori ai acizilor nucleici.

Prin analogie cu nomenclatura proteinelor din Virologie (*VP – Viral Protein*), această proteină infecţioasă şi patogenă a fost denumită *proteina prionică* (*PrP*, Prusiner, 1983, Mc Kinley 1983).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Studiile asupra bolii *scrapie*, semnalată încă din secolul XVIII în Marea Britanie au incriminat, în ultimele 5 decenii, peste 20 de tipuri de agenţi patogeni, incluzând virusuri, viroizi, protozoare, macromolecule replicabile etc.

Problema originii prionilor a fost lamurită după ce Bassler (1986) a semnalat în creierul de hamster infectat cu scrapie, prezenţa a două izoforme de proteine prionice.

Prusiner (1986, 1993) a demonstrat că prionii reprezintă forma modificată a unei proteine celulare normale (PrP^c), la om codificată de o genă cromosomală (Prn-p), situată pe braţul scurt al cromosomului 20.

Proteina prionică neuronală (PrP^c) este sintetizată normal, în celulele neinfectate, în cantităţi limitate, la nivelul reticulului endoplasmic, este modificată în aparatul Golgi şi transportată la suprafaţa neuronilor, unde este "ancorată" de membrana celulară printr-o "ancoră" glicoproteică. De la acest nivel, PrP^c este endocitată şi probabil recirculată, fiind final degradată de proteaze, ca parte a metabolismului celular. PrP^c este nepatogenă şi netransmisibilă. Structura ei spaţială este de tip alfa-helix, iar funcţia este necunoscută.

Mutaţiile punctiforme, extrem de rare la nivelul genei Prn-p (codificatoare a proteinei PrP^c), au drept consecinţă formarea unei proteine prionice modificate, denumită după numele bolii la care a fost studiată, *PrP scrapie sau* PrP^{sc}. Această denumire a fost păstrată pentru agenţii patogeni (prioni) ai tuturor bolilor din această familie, deoarece acest mecanism a fost demonstrat ca fiind comun, inclusiv în cazul maladiilor prionice umane.

Studiul secvenţei aminoacizilor la cele două tipuri de proteine a demonstrat prezenţa a peste 18 tipuri de mutaţii punctiforme. Cele mai frecvente sunt cele care determină înlocuirea aminoacidului numărul 66 (glicocol din PrP^c, cu prolina în PrP^{sc}, sau a aminoacidului numărul 102 (leucina) din PrP^c, cu prolina în PrP^{sc}.

Prusiner şi Hsiao (1988) au stabilit existenţa unei relaţii directe între mutaţii şi maladie, evidenţiind prezenţa acestora în structura PrP^{sc} la toţi pacienţii cu maladii prionice.

După ce s-a sintetizat, proteina scrapie (Prp^{sc}) acţionează asupra echivalentului său celular normal PrP^c, în sensul că, venind în contact cu aceasta, determină deplierea ei de la forma normală de alfa-helice şi replierea ei într-o conformaţie nouă, de tip *beta-pliere*. Aceasta conversie face PrP^{sc} rezistentă la degradarea cu proteaze şi îi conferă caracterul infecţios şi patogen.

"Replicarea" prionilor. După inocularea experimentală a animalelor sensibile cu diluţii foarte mari de omogenat de creier infectat cu scrapie, sau de la bolnavi cu maladia Creutzfeldt-Jakob, în creierul acestora se acumulează mari cantităţi de prioni (până la 10^8 DL_{50} unităţi infecţioase).

Prionii prezenţi în neuroni, indiferent de provenienţă, *endogenă* (după mutaţii punctiforme în gena Prn-p) sau *exogenă* (prin infecţie), interacţionează cu moleculele normale de proteină prionică celulară (PrP^c), pe măsură ce acestea sunt sintetizate, imprimându-le propria lor conformaţie specială (structura de tip beta-pliere), transformându-le în proteine prionice (PrP^{sc}). Deoarece sunt rezistente la degradarea enzimatică, proteinele prionice se acumulează în celule, determinând vacuolizarea şi necroza acestora. Prionii eliberaţi pe această cale, interacţionează cu alţi neuroni normali, determinând extinderea procesului patologic. Locul neuronilor distruşi este luat de celulele gliale.

Maladia apare în populaţii de organisme cu predispoziţie genetică, dar faptul că se poate propaga prin inoculare, respinge ideia caracterului pur genetic.

Pasajul prionilor între organismele diferitelor specii este un proces întâmplător, caracterizat printr-o perioadă lungă de incubaţie. Prin pasaje succesive la indivizi ai aceiaşi specii, timpul de incubaţie se scurtează progresiv de la un pasaj la altul şi procesul propagării nu mai este întâmplător. Bariera de specie nu funcţionează (sau nu funcţionează totdeauna) şi are importanţă practică pentru evaluarea riscului ca omul sa dezvolte maladia Creutzfeldt-Jakob, după consumul creierului de oaie infectată cu scrapie sau de bovine infectate cu prionul encefalopatiei spongiforme.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

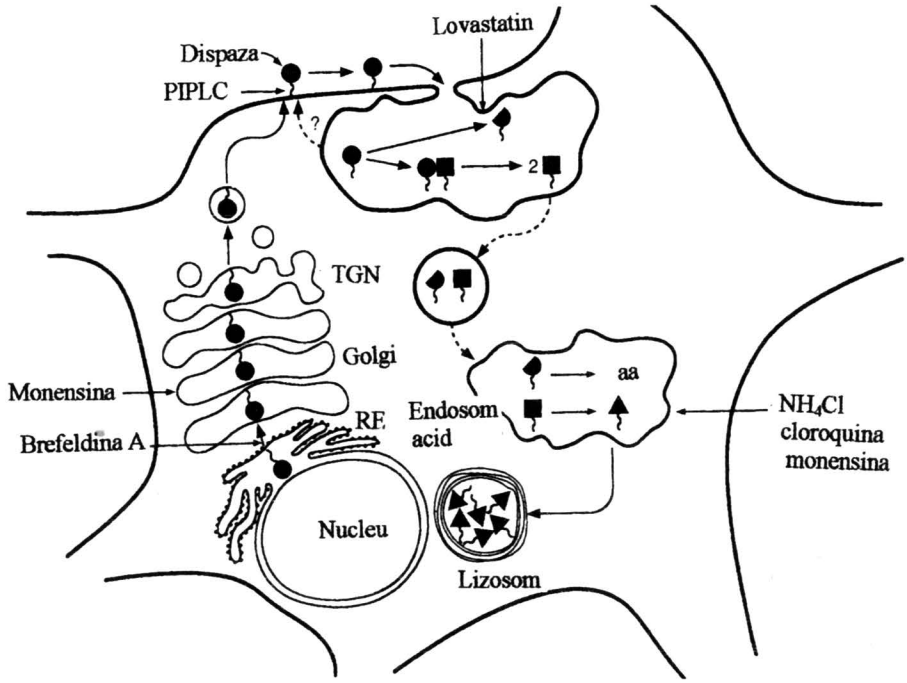


Fig. 198. Căile sintezei şi degradării proteinei prionice în celulele cultivate. Pătratele simbolizează PrP^{Sc}, iar cercurile semnifică PrP^{C}. PrP^{C}, precursorul PrP^{Sc} este sensibilă la digestia cu dispază sau la PIPLC, adăugate în mediu. PrP^{Sc} apare în compartimentele derivate din membrana plasmatică, aşa cum sunt endosomii timpurii şi caveolele, ambele având pH neutru. În celulele cultivate, dar nu în creier, capătul N-terminal al PrP^{Sc} este clivat şi rezultă PrP 27-30. PrP^{Sc} se acumulează în special în lizosomii secundari. Inhibiţia sintezei PrP^{Sc} cu brefeldina A evidenţiază că reticulul endoplasmic şi cisternele Golgi nu au rol în sinteza sa. Se crede că PrP^{Sc} derivă din PrP^{C} printr-un proces spontan, de modificare post-traducere ce are loc la persoanele cu predispoziţie genetică. Într-un proces infecţios, sinteza PrP^{Sc} pare să necesite interacţiunea PrP^{C} cu proteina PrP^{Sc} exogenă (infecţioasă), în cursul căreia PrP^{C} este convertită la proteina patologică (după Prussiner, 1996).

Patogenitate. Prionii produc o varietate de boli neurologice degenerative, care afectează ovinele şi caprinele (boala scrapie), bovinele (encefalopatia spongiformă sau boala "vacilor nebune"), felinele, cervidele, nurcile etc., precum şi omul.

Bolile prionice sunt limitate la sistemul nervos central şi evoluează cu leziuni degenerative tipice pentru encefalitele spongiforme. Ele sunt neobişnuite prin faptul că pot să apară spontan în populaţie, fără nici o cauză aparentă (aşa numitele forme sporadice) sau pot fi ereditare şi familiale. In ambele tipuri de maladii, prionii sunt infecţioşi şi pot fi transmişi prin inoculare la organisme ale aceleiaşi specii sau ale unei specii înrudite.

După inoculare, perioada de incubare este de 1-3 ani. Odată declanşate, bolile prionice au o evoluţie clinică cu agravare progresivă de-a lungul mai multor luni sau ani, care duce invariabil la moarte. Experienţele pe oi şi capre, prin inoculare intracerebrală, orală, subcutanată, intramusculară sau intravenoasă, au arătat că există grade diferite de sensibilitate între diferitele rase de animale, mai ales după inocularea subcutanată, ceea ce sugerează că fondul genetic influenţează decisiv sensibilitatea la infecţia prionică. Adeseori, multe din animalele inoculate, nu dezvoltă maladia.

Leziunile produse de prioni sunt limitate la nivelul sistemului nervos central şi includ vacuolizarea şi necroza neuronală, degenerarea spongiformă a ţesutului cerebral, reacţii astrogliale cu hipertrofia astrocitelor şi proliferarea lor în cortex. In locul neuronilor distruşi prin necroză, apar "găuri" care conferă creierului un aspect spongios. La unele organisme se observă depunerea unor plăci de amiloid (colorabile cu roşu de Congo), în sistemul nervos central. Ele ar putea fi formate din proteine prionice sau din agregate de prioni.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Boala scrapie (tramblanţa) afectează ovinele şi caprinele. Boala se instalează după 2-5 ani de la contaminare, cu tulburări neurologice: prurit intens, dificultate în mers (prin hipoplazia cerebelului), cu agravare progresivă, până la imobilitate totală, cu sfârşit letal. Principalele leziuni apar însă în creier, care degenerează lent.

Infecţia se face pe cale digestivă şi iniţial evoluează la nivelul sistemului limfoid, de unde răspândirea în organism, se face pe calea nervilor, a fibrelor din nevrax şi pe cale sanguină. Apariţia maladiei trebuie urmată de sacrificarea întregului efectiv de animale.

Maladiile prionice umane sunt fie de natură infecţioasă, fie sunt moştenite prin predispoziţie genetică, iar altele au caracter sporadic (apar fără cauze cunoscute).

Formele infecţioase ale maladiei prionice sunt rezultatul transmiterii orizontale a prionilor infectioşi. Cele mai cunoscute sunt boala "kuru" şi boala Creutzfeldt-Jacoob.

Boala "kuru"* afectează exclusiv populaţia tribului Fore din Papua-Noua Guinee şi este caracterizată prin lipsa coordonării motorii, accentuată progresiv, astfel încât bolnavii necesită sprijin atât aşezaţi, cât şi în poziţie verticală. Maladia se transmite pe cale digestivă, datorită canibalismului ritual (cinstirea înaintaşilor prin consumul creierului cadavrelor).

Boala Creutzfeldt-Jacob (CJD) are o frecvenţă de 1 la un milion şi apare în jurul vârstei de 60 de ani, cu mişcări anormale, rigiditate, tulburări psihice de tip demenţial. Poate apărea sporadic, ereditar-familial sau prin infecţie exogenă, după unele practici medicale (transplant de cornee sau de duramater, injecţii de hormoni hipofizari, în special a celor de creştere, obţinuţi din hipofiza umană, implantarea electrozilor contaminaţi pentru EEG, operaţii chirurgicale cu instrumente contaminate).

Sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) este o varietate naturală a bolii Creutzfeldt-Jacob, caracterizată prin instalarea precoce a incapacităţii de coordonare a mişcărilor, prin leziuni cerebeloase şi demenţă.

Insomnia familială letală (IFL) debutează cu tulburări ale somnului şi ale sistemului nevos vegetativ, urmate de demenţă.

Descoperirea mutaţiilor în genele PrnP la bolnavii cu CJD, GSS şi IFL, a dus la concluzia că bolile prionice sunt atât genetice cât şi infecţioase.

Existenţa prionilor (proteine infecţioase, replicabile pe o cale neobişnuită), a sugerat posibilitatea transmiterii unor maladii infecţioase în absenţa unui transfer de material genetic codificator al sintezei proteice, ceea ce este în contradicţie cu dogmele biologiei moleculare, ale virologiei şi microbiologiei.

Ideia că o proteină este capabilă de autoreplicare printr-o interacţiune proteină-proteină, în absenţa informaţiei genetice şi a circulaţiei ei în celulă, după modelul clasic este greu de acceptat.

Chesebro şi Fields (1996) consideră că este posibil ca PrP (proteina rezistentă la proteaze) să aibă un rol important în patogeneza maladiei, fără să fie agentul cauzal. Ea ar funcţiona ca un receptor sau ca un cofactor necesar pentru agentul cauzal sau pentru un virus ubicvitar, cu mare rezistenţă la inactivare.

Modificarea structurală a PrP^{c} la PrP^{sc} ar putea fi rezultatul acţiunii unei proteine necunoscute, cu rol de *chaperonină* (Guillemet şi col., 1996).

Este posibil ca prezenţa prionilor să fie mult mai largă în natură, şi oricum, nelimitată strict la mamifere.

După Prusiner (1995), este posibil ca mai multe boli nervoase cronice (demenţa presenilă umană de tip Alzheimer, maladia Parkinson, scleroza multiplă, scleroza laterală amiotrofică etc.), cu etiologie necunoscută, să fie produse sau influenţate în evoluţie, de intervenţia unor agenţi patogeni subvirali, de tipul prionilor.

---

* Termenul "kuru" reflectă principalele simptome ale bolii şi este tradus prin "a tremura de frică, " a se infiora" sau "moartea zâmbind".

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Natura virusurilor

În acord cu concepţia veche, virusurile sunt organisme primitive ("contagium, vivum, fluidum" – aşa cum le-a definit Beijerinck în 1897). Concepţia a dăinuit datorită prezenţei în structura virusurilor, a două componente definitorii pentru lumea vie – acizii nucleici şi proteinele. Dar proprietăţile particulare ale sistemelor biologice nu sunt date de moleculele componente, ci de nivelurile superioare de integrare funcţională a componentelor structurale.

În sprijinul aceleiaşi concepţii, a apartenenţei virusurilor la lumea vie, a fost invocat procesul multiplicării lor, considerat ca fiind analog multiplicării celulelor bacteriene. Studiile ulterioare de biologie moleculară, au evidenţiat diferenţierea netă, de fond, între multiplicarea virală şi multiplicarea bacteriană: virusurile se mutiplică într-un substrat celular viu, pornind exclusiv de la genomul viral, după modelul furnizat de informaţia genetică înscrisă în genom.

Dintre marii virologi, foarte puţini susţin ca virusurile sunt vii. Luria (1973) le consideră vii, pornind de la un punct de vedere foarte original de a defini sistemele biologice: el consideră că un sistem biologic (care are calitatea de viu) este o entitate care, după ce a fost izolată îşi păstrează o configuraţie specifică şi prin aceasta, posibilitatea de a fi reintegrată în circuitul materiei vii. Din acest punct de vedere, virusul este un organism într-o măsură mai mare chiar decât o celulă din organismul unui metazoar. Viaţa reprezintă capacitatea de a reproduce un anumit tip de organizare specific şi independent: după Luria, o moleculă de ADN, *in vitro,* este vie, pentru că îşi păstrează configuraţia, are o structură şi o organizare proprie, un anumit grad de autonomie (independenţă).

Crick este de părere că încadrarea virusurilor în sistemele vii, înseamnă a extinde proprietăţile lor dincolo de anumite limite. Virusul separat nu este viu, dar sistemul virus-celulă, are toate proprietăţile sistemului biologic.

Cei mai mulţi autori consideră că încadrarea virusurilor în lumea vie este imposibilă, artificială sau forţată. Dificultatea majoră a încadrării virusurilor în categoria sistemelor vii sau nevii, decurge din faptul că, în prezent nu există o definiţie unanim acceptată a vieţii. Definiţiile se reduc la o enumerare a proprietăţilor observabile ale unui organism, dar multe din aceste proprietăţi se întâlnesc şi la formele de organizare ale materiei neanimate. Szent-Gyorgyi consideră că viaţa este o calitate a unor sisteme fizice, o expresie a interacţiunilor dintre structurile care alcătuiesc sistemul, dar este greu de definit.

După Crick (1966), un sistem biologic trebuie să îndeplinească trei condiţii minimale: 1) să aibă capacitatea de creştere; 2) să aibă metabolism (să facă sinteze moleculare şi să producă energie); 3) să producă descendenţi identici.

Monod (1971) consideră că sistemele biologice sunt singurele din univers, dotate cu următoarele patru proprietăţi definitorii esenţiale:

1) morfogeneza autonomă (proprietatea de a se construi ele însile); 2) emergenţa (proprietatea de reproducere); 3) reproducerea invariantă la nivel molecular (cu caracter predominant nevarietar, fără a exclude variaţiile); 4) teleonomia (proprietatea de a avea o structură şi o organizare adaptate supravieţuirii individului şi speciei).

A. Rich (1980) caracterizează sistemele vii, în funcţie de fluxul diferitelor elemente şi procese pe care le desfăşoară. Sistemele biologice prezintă un flux de energie şi un flux de informaţie, care coordonează multitudinea reacţiilor chimice.

Pentru A. Lwoff (1981), organismul viu este un sistem ordonat şi integrat, de structuri şi funcţii interdependente, capabil de metabolism, creştere şi reproducere. Ceea ce determină complexitatea unui organism superior organizat, în raport cu un virus nu este complexitatea superioară a moleculelor sale, ci gradul mai înalt de organizare şi integrare a acestor molecule.

După F. Jacob (1970), distincţia dintre viu şi neviu, o constituie raportul celor două categorii de sisteme cu *timpul.* Corpurile nevii nu depind de timp, pe când organismele vii sunt indisolubil legate de timp, în sensul că sunt rezultatul unui proces istoric evolutiv.

Însumând aceste criterii, uneori complementare, prin care sunt definite sistemele biologice, concluzia este că unitatea fundamentală (ce răspunde acestor criterii), care stă la baza organizării tuturor sistemelor biologice este *celula.*

Dintre toate celulele cunoscute, bacteria reprezintă cea mai simplă unitate de integrare şi reproducere, care reuneşte calităţile de *organizare, autonomie şi invarianţă,* prin care se

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

caracterizează sistemele vii. Celula bacteriană constituie un minim vital. Nivelul inferior celulei bacteriene se defineşte în termeni de chimie şi de fizică, iar sistemele superioare, în termeni de organizare (F. Jacob, 1970).

Conceptul de virus, definit pe baza însumării unui număr mare de criterii discriminatorii faţă de celula bacteriană, reflectă o totală lipsă de concordanţă şi absenţa oricărei afinităţi structurale şi functionale între virusuri şi sistemul biologic în forma sa cea mai simplă – celula bacteriană.

Virusurile realizează complexe biologice numai în contextul procesului infecţios în celula sensibilă. In afara celulei, virusul este inert.

"Pentru că virusurile nu sunt nici organisme, nici celule, ele nu sunt fiinţe vii. Virusurile sunt virusuri pentru că virusurile sunt virusuri" (A. Lwoff, 1962, 1981).

Evoluţia virusurilor

Deşi virusurile au o organizare structurală foarte simplificată, totuşi sunt considerate a fi entităţi foarte evoluate, deoarece, ca parazite absolute ale sistemului celular şi având un genom de dimensiuni reduse, sunt foarte eficiente în exploatarea interacţiunii cu aparatul celular genetic şi de biosinteză, subordonându-le total multiplicării lor.

Virusurile codifică funcţiile minime necesare multiplicării, de subordonare a activităţilor vitale ale celulei şi de reorientare a lor pentru sinteza componentelor virale. Secvenţele neinformaţionale ale genomului viral sunt minime şi au rolul de a media circularizarea moleculei sau au un rol reglator. Virusurile şi-au amplificat capacitatea de codificare, utilizând mai mult decât un cadru de citire a aceleiaşi secvenţe, pentru a codifica proteine distincte, fie prin iniţierea traducerii mesajului la puncte diferite, fie prin înădirea în diferite variante a ARNm.

A II-a structură cu rol major în evoluţia virusurilor este *capsida*. Alcătuirea ei trebuie să răspundă la două necesităţi funcţionale opuse: a) să fie suficient de stabilă pentru a asigura protecţia genomului în mediul extracelular; b)în acelaşi timp, să fie suficient de labilă pentru a se dezasambla uşor după intrarea virusului în celulă.

Virusurile sunt foarte diverse ca structură, dimensiuni, strategii de multiplicare. Ele pot fi împărţite în trei grupe:

1) Virusuri cu genom ADN

2) Virusuri cu genom ARN

3) Virusuri care, în diferite stadii ale ciclului de multiplicare, au genom alternativ, ADN sau ARN (retra-, hepadna, caulimovirusuri).

Virusurile cu genom ADN se deosebesc profund de cele cu genom ARN, ceea ce sugerează că au origini diferite.

Virusurile, ca grup de entităţi cu proprietăţi funcţionale cu totul particulare, nu au afinităţi cu organismele procariote cele mai simple. Intre virusuri şi procariote există un hiatus întru-totul comparabil cu cel existent între tipul de organizare procariot şi eucariot sau între organismele unicelulare şi pluricelulare.

Privite în contextul geneticii moleculare, virusurile, şi în special cele cu capacitate de integrare în genomul celulei, au unele proprietăţi care le permit încadrarea într-un *continuum de elemente genetice*, alături de virusoizi, viroizi, plasmide, elemente genetice transpozabile (transpozonii şi secventele de inserţie). Virusurile de deosebesc de toate aceste entităţi genetice, prin parazitismul lor absolut şi prin existenţa unei etape independente de celulă (virionul).

Pentru a explica originea virusurilor s-au propus trei teorii:

1) Teoria evoluţiei regresive

2) Teoria originii din ARN şi/sau ADN

3) Teoria evoluţiei virusurilor ca o linie separată, din molecule primare cu capacităţi de autoreplicare.

Teoria evoluţiei regresive consideră ca virusurile sunt rezultatul simplificării treptate a structurii şi funcţiei unor organisme parazite intracelular. Simplificarea merge până la păstrarea, numai a capacităţii de replicare a ADN şi a mecanismelor de interacţiune cu aparatele de biosinteză şi de replicare a macromoleculelor celulei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Scara simplificării structurii şi funcţiilor, ca o consecinţă a parazitismului, include protozoarele parazite (plasmodiul malariei), bacilul leprei, rickettsiile. Ultimele sunt bacterii Gram negative, care se multiplică prin diviziune directă, fiind capabile să realizeze activităţi biosintetice proprii. Chlamidiile sunt procariote parazite, cu o şi mai accentuată pierdere a capacităţii de biosinteză. Ele nu au perete celular, dar au ADN şi ARN şi se divid pornind de la ansamblul integrat al structurilor celulare. Mult timp au fost considerate ca virusuri, dar de fapt sunt bacterii foarte simplificate. Acelaşi proces – al simplificării structurale şi funcţionale – ar fi stat la baza genezei organitelor celulare – mitocondrii şi cloroplaste – cu dimensiuni asemănătoare cu ale bacteriilor. Ele conţin ADN cu configuraţie circulară (ca şi ADN bacterian), dar de dimensiuni mai mici şi codifică sinteza ARNr şi ARNt. Proteinele sintetizate rămân localizate în aceste organite. Asemănările ARNr bacterian 16S şi ARNr din mitocondriile celulei vegetale, sprijină ideia evoluţiei acestor organite din celulele procariote.

Între microorganismele obligatoriu parazite şi virusuri, nu există nici o punte de legătură şi nici o afinitate structurală sau funcţională. În contextul acestei teorii, virusurile ar fi apărut prin evoluţia regresivă a unor organite celulare. Astfel, capsida ar putea fi omologată cu un organit (flagel bacterian, filamente de actină), ce se autoasamblează din monomeri proteici. Spre deosebire de organite, virusurile şi-au păstrat capacitatea de a împacheta informaţia genetică în proteine proprii.

Originea virusurilor din acizii nucleici celulari

Teoria presupune că genomul celular are proprietatea de a genera molecule (prin replicare şi transcriere), care la rândul lor dobândesc capacitatea de a se replica independent şi implicit, potenţial de evoluţie.

Secvenţele de ARN pot să realizeze trei tipuri de activităţi enzimatice (catalitice):

a) funcţia de matriţă, pentru sinteza unor catene noi

b) reacţia de "înădire", consecutiv căreia, unele secvenţe nucleotidice interne sunt eliminate;

c) activitate RN-azică (ribozimică).

Aceste activităţi sunt proprii moleculelor de ARN genomice ale viroizilor şi virusoizilor, cele mai mici molecule care se replică autonom. Viroizii sunt molecule de ARN circulare, monocatenare, care produc îmbolnăviri la câteva genuri de plante. Sediul replicării lor este nucleolul. Replicarea este catalizată de ARN-polimeraza II celulară, dependentă de ADN din nucleoplasmă, care "greşeşte" ţinta.

Virusoizii sunt molecule de ARN de aceleaşi dimensiuni ca şi ale viroizilor, dar se acoperă cu o capsidă proteică, codificată de un virus helper.

Virusul hepatitei delta se aseamănă cu virusoizii. Genomul său conţine o genă codificatoare pentru o proteină structurală.

Existenţa viroizilor şi virusoizilor, a condus la ipoteza originii virusurilor din molecule de ARN autoreplicative, sub acţiunea catalitică a polimerazelor celulare. Astfel ar fi rezultat repliconi ARN concatemeri, iar prin transcriere inversă au evoluat genomurile virale ADN.

În celule se găsesc molecule de ADN cu capacitatea de autoreplicare (plasmide, transpozoni). Unele (retrotranspozonii) se replică după o secvenţă similară cu a retravirusurilor (se replică printr-un intermediar ARN, care ulterior este revertranscris la ADN).

Cel puţin uneori, genele plasmidei formează o unitate genetică mobilă, denumită *transpozon*. Transpozonii sunt secvenţe de ADN (750 – 40 000 pb), care se pot deplasa de la un situs la altul al moleculei de ADN, prin excizie şi reintegrare, chiar în absenţa unei secvenţe omologe de baze. Mobilitatea lor este mediată de *secvenţele de inserţie*.

Elementele genetice mobile accelerează rata evoluţiei genomului, prin deplasarea unor gene între plasmide şi cromosomi.

Transpozonii din structura genomului viral se pot deplasa între genomurile celulelor infectate şi accelerează rata evoluţiei virale şi celulare, realizând noi combinaţii de gene.

Secvenţele de inserţie au un impact marcant asupra evoluţiei virale, deoarece, după inserţia în cromosomul viral, pot să determine inactivarea unei gene (mutaţie prin inserţie), sau pot să activeze transcrierea genei adiacente situsului de inserţie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Multe virusuri cu genom ADN se aseamănă, prin organizarea lor genomică, cu transpozonii, deoarece au secvenţe terminale repetate invers (*Herpes, Adenovirus*). Intre secvenţele terminale se găsesc genele de replicare. Organizarea similară a transpozonilor şi a genomului unor virusuri, este rezultatul unei origini comune sau a unei evoluţii convergente, adică al adaptării la o strategie comună ?

Prin asemănarea sa cu transpozonii, un interes deosebit prezintă fagul *Mu* (*Mu*tator), infecţios pentru *E. coli* K_{12}. Fagul *Mu* nu urmează niciodată ciclul litic direct, ci lizogenizează celulele infectate. Inserţia sa ca profag în cromosomul celulei, nu pare a avea situsuri specifice, ci se face aleatoriu, producând mutaţii cu o frecvenţă foarte mare. Mai mult, genomul fagic integrat se deplasează continuu la diferite situsuri cromosomale, reintegrându-se în oricare din cele două orientări posibile. Ulterior, sub acţiunea unui semnal necunoscut, profagul *Mu* este transcris în numeroase copii, care se integrează în cromosomul de *E. coli*. Molecula de ADN este secţionată sub acţiunea nucleazelor şi eliberează copiile genomului viral. Se sintetizează proteine virale şi se asamblează fagi progeni.

Fagul *Mu* este considerat un transpozon de tip special, de dimensiuni mari, care codifică nu numai enzima de transpoziţie, ci şi toate proteinele necesare procesului de asamblare a capsidei.

Teoria originii virusurilor din moleculele de acizi nucleici ai celulei se bazează pe capacitatea de recombinare a virusurilor. Frecvent, ADN viral se integrează în cromosomii celulei. În special virusurile defective pot dobândi gene celulare, care devin parte componentă a genomului lor. ADN celular face schimb de secvenţe nucleotidice cu ADN sau cu ARN viral, cu plasmidele, cu transpozonii şi cu retrotranspozonii.

Existenţa numeroaselor omologii între genele virale şi celulare este un argument pentru originea virusurilor din acizii nucleici celulari. Esenţa unui virus este chiar interferenţa sa cu aparatul genetic şi metabolic al celulei. Pentru virusurile care se multiplică în nucleu, proteinele se sintetizează în citoplasmă, ca şi proteinele nucleare ale celulei normale. În acelaşi sens pledează numeroasele omologii dintre oncogenele celulare care controlează creşterea şi diferenţierea şi oncogenele retravirusurilor.

Dacă pentru virusurile cu genom ADN şi pentru retravirusuri, ipoteza originii în ADN celular pare a fi argumentată, originea ribovirusurilor care nu au o fază de tranziţie prin ADN este sub semnul întrebării.

De ce există o diversitate aşa de mare a ribovirusurilor ? Au toate o origine comună sau sunt un grup polifiletic ?

Cea mai simplă schemă evolutivă poate sugera ca virusurile cu genom ADN şi retravirusurile au o origine comună, iar celelalte clase de ribovirusuri au evoluat una din alta (Baltimore, 1998). Este greu de explicat modul în care ribovirusurile, cu catena de polaritate pozitivă, se înrudesc cu cele ce au genom de polaritate negativă. ARN-polimerazele celor două clase de ribovirusuri sunt foarte diferite şi ori au apărut separat ori sunt foarte îndepărtat înrudite.

Baltimore consideră că cele patru clase de virusuri cu genom ARN (cele cu catena de polaritate pozitivă, negativă, cele cu genom dublu catenar şi retravirusurile) sunt linii evolutive independente. Dacă trei din cele patru sisteme genetice pot avea unele afinităţi, virusurile cu genom ARN dublu catenar (reovirusuri) par a fi o linie evolutivă cu totul diferită. Ele îşi au originea, probabil, în virusurile infecţioase pentru fungi, pentru că virusuri asemănătoare sunt mai comune la acest grup.

Strauss presupune că rata înaltă de evoluţie a virusurilor cu genom ARN ar fi permis ca toate familiile actuale să fi apărut prin divergenţă, de la un strămoş ancestral comun. Dovezile în acest sens sunt insuficiente, dar omologia enzimelor de replicare şi a altor funcţii virale pot fi argumente în favoarea acestei ipoteze.

Recombinarea la dezoxiribovirusuri

Mecanismele de recombinare şi transpoziţie permit virusurilor cu genom ADN să dobândească gene noi, să se integreze şi să se excizeze din cromosomii celulei gazdă, să preia gene din celulă şi să le transfere la o nouă gazdă. Virusurile cu genom ADN posedă toate

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mecanismele recombinatoriale care funcţionează în lumea vie, cea ce le conferă posibilitatea unor rearanjari genomice profunde şi a unor interacţiuni genetice extensive cu ADN al celulei gazdă. Multe virusuri cu genom ADN conţin gene luate din celula gazdă. De exemplu, genele timidin-kinazei (Tk) a virusurilor herpes, a evoluat din enzimele deoxicitidin-kinazei, iar gena pentru Tk de la poxvirusuri, a derivat din genele Tk celulare.

Ubicvitatea, mobilitatea şi capacitatea crescută de recombinare, plasează virusurile, alături de alte elemente genetice mobile, în prim planul evoluţiei pe Pământ.

Cele mai multe virusuri cu genom ADN, au rate de mutaţie inferioare ribovirusurilor. Mutabilitatea lor este puţin cunoscută, dar este dedusă indirect din diferite observaţii: de exemplu, virusurile herpetice pot deveni rezistente la medicaţia antivirală, fapt ce creează probleme clinice.

Retravirusurile, hepadna- şi caulimovirusurile au proprietatea unică de a aparţine atât ribo- cât şi dezoxiribovirusurilor. Ele au evoluat, probabil din elemente *retroide,* adică secvenţe genice transcrise într-o moleculă de ARN, dar transcrise invers de o ADN-polimerază dependentă de ARN.

Retravirusurile au capacitatea de a se recombina în stadiul de ADN, ca provirusuri. Revers-transcriptaza are tendinţa de a se comuta de la o matriţă la alta, în timpul sintezei primei catene de ADN (mecanismul alegerii matriţei). Comutarea de la o matriţă la alta, se produce cu o frecvenţă mare şi determină majoritatea evenimentelor de recombinare ale retravirusurilor, care poate avea rol major în evoluţia grupului.

Originea şi evoluţia ribovirusurilor

Virusurile cu genom ARN sunt diverse şi ubicvitare. Ele includ ribovirusurile propriu-zise şi retravirusurile.

Moleculele de ARN pot funcţiona ca matriţe pentru sinteza unei noi catene complementare. De aceea, se consideră ca unele ribovirusuri pot să aibă originea în repliconi primordiali de ARN. La originea ribovirusurilor, ar putea să fie molecule de ARNm cu capacitate autoreplicativă. De exemplu, ARNm codificator al ARN-polimerazei dependentă de ADN, dobândind capacitatea de autoreplicare, prin asociere ulterioară cu o genă codificatoare a unei proteine, generează un virus simplu cu genom ARN.

Alte virusuri, probabil, au derivat mai recent, prin procese de *recombinare,* de *reasortare* a informaţiei genetice sau prin *mutaţia* ARN celular.

Cele mai multe ribovirusuri au schimbat secvenţe cu ARN celular, astfel că genomul lor este un mozaic de secvenţe din surse multiple. Prin recombinarea segmentelor genomice de la două sau mai multe virusuri diferite, pot să apară ribovirusuri noi. De exemplu, virusul encefalitei equine de vest este rezultatul unei recombinări între virusurile encefalitei equine de est şi virusul Sindbis. Tehnicile de inginerie genetică permit crearea unor virusuri noi, "hibride", prin recombinare.

Virusurile se multiplică rapid, formându-se un număr mare de particule progene, suferă mutaţii, se recombină şi îşi reasortează materialul genetic şi de acea manifestă o mare plasticitate şi adaptabilitate. Toate acestea creează posibilitatea unei evoluţii foarte rapide. Dar virusurile, asemenea organismelor vii pot avea perioade de relativă stază evolutivă, întrerupte de perioade scurte, în cursul cărora modificările genetice sunt rapide.

Recombinarea la ribovirusuri. Ribovirusurile au rate foarte înalte de recombinare a genmului, datorită frecventei *schimbări a matriţei* de la o catenă la alta de ARN, pe care o face ARN-polimeraza (replicaza).

Virusurile cu genom ARN monocatenar de polaritate pozitivă realizează procese de recombinare omologă în timpul replicării pe matriţa cu o secvenţă complementară de baze. Astfel de *recombinări omologe,* sunt importante pentru evoluţia virusurilor ARN. De exemplu, la persoanele vaccinate cu virus polio atenuat, apar frecvent recombinanţi între serotipurile din vaccin.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Recombinarea heterologă poate produce schimbări majore ale genomului, de mare importanţă evolutivă. De exemplu, virusul hepatitei murine pare să-şi fi dobândit gena pentru hemaglutinin-esterază, prin recombinare cu virusul influenza C.

La ribovirusurile cu genom de complementaritate negativă, care îşi replică genomul ca o catenă ribonucleoproteică, recombinarea este un eveniment mai rar. Catena de ARN în curs de sinteză, fiind ribonucleoproteică, nu se poate alinia cu exactitate catenei matriţă, fapt considerat ca generator al *recombinărilor neomologe*. Astfel de recombinări produc particule defective interferente, cu efect modulator asupra multiplicării virale.

Uneori, se pot produce recombinări bizare între ARN celular şi genomul viral ARN. De exemplu, un segment de 54 nucleotide din ARNr 28S s-a inserat prin recombinare, în gena pentru HA a virusului influenza în timpul replicării în celulele embrionului de găină. Virusul recombinant a fost mai virulent.

Reasortarea segmentelor genomice la ribovirusuri. La virusurile cu genom segmentat, diferite segmente genomice de la virusuri genetic diferite, dar înrudite, se pot recombina, rezultând virusuri recombinate. Schimbul de material genetic se numeşte *reasortare genetică* şi este echivalentă cu reasortarea cromosomilor materni şi paterni ce are loc în meioza gametogenezei la organismele diploide eucariote.

Reasortarea segmentelor genomice la ribovirusuri, are loc atunci când două virusuri distincte infectează simultan aceiaşi celulă. Pandemiile de gripă asiatică (1958) şi Hong-Kong (1968) au început în sudul Chinei. Noile variante genetice gripale au apărut prin reasortarea segmentelor genomice derivate de la virusurile aviare şi de la cele umane. In deceniile următoare, este de aşteptat o nouă pandemie majoră de gripă, care se va datora reasortării genomului virusului influenza A, ce se va produce la porc, în tractul respirator al altei specii sau chiar la om.

Reasortările genice majore între virusul aviar şi influenza umană sunt rare, deoarece segmentele genomice realizează interacţiuni optime reciproce în asociere homologă şi nu în reasortare heterologă. De fapt, fenomenul reasortării este foarte frecvent, dar şansa interacţiunii eficiente a segmentelor genomice heterologe este foarte mică, ceea ce restrânge foarte mult probabilitatea emergenţei unei pandemii de influenza A.

Rolul mutaţiilor în evoluţia ribovirusurilor

Mutaţia este forţa motrice a evoluţiei sistemelor vii. Virusurile nu întrunesc criteriile minimale ale celui mai simplu sistem viu, dar evenimentele mutaţionale au o frecvenţă mare. In general, genomul ribovirusurilor are dimensiuni reduse, iar rata de mutaţie/nucleotid/tur de replicare este maximă, fapt care permite o rată de evoluţie de milioane de ori mai rapidă decât a gazdelor lor. Supuse permanent presiunii selective a factorilor de apărare a gazdei, evoluţia virusurilor este exclusiv adaptativă. Ratele foarte înalte de mutaţie, generează aşa numitele "mutante de roire" sau populaţii de *quasispecii* de virusuri, care conferă o mare adaptabilitate replicării virale, menită să compenseze şansa minimă a interacţiunii cu substratul permisiv.

Pe de altă parte, rata mutaţiei nu trebuie să depăşească un "prag al erorilor", care ar genera un virus incapabil de multiplicare. Quasispeciile de virusuri ARN, se adaptează la un prag de erori mutaţionale, campatibil cu multiplicarea. Virusurile se multiplică la limita superioară a mutabilităţii şi adaptabilităţii. Datorită ratei înalte a mutaţiei, clonele de ribovirusuri şi retravirusuri sunt quasispecii sau "mutante roitoare", care prezintă variaţii genetice genomice.

Populaţiile de quasispecii conferă virusurilor cu genom ARN o adaptabilitate perfectă la mediul gazdei şi o capacitate de evoluţie foarte rapidă. Anumite secvenţe ale genomului sunt mai stabile decât altele, dar şi cele mai stabile suferă mutaţii cu o rată superioară în raport cu dezoxiribovirusurile.

Mutabilitatea accentuată se datorează naturii intrinseci a funcţiei ARN-polimerazei virale, predispusă la erori ("error prone"), ca o consecinţă a absenţei funcţiei de corectare ("proof reading"), în timp ce majoritatea ADN-polimerazelor virale îşi corectează erorile proprii. Diferite familii de ribovirusuri au rate diferite de mutaţie. Dintre enzimele de transcriere

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

şi replicare a genomului ARN, revers-transcriptazele au o predispoziţie mai accentuată la erori, ceea ce se corelează cu o rată înaltă a mutaţiei în ciclul lor de multiplicare. Genomul integrat al retravirusurilor este copiat de aparatul enzimatic al celulei, cu o fidelitate relativă şi de aceea, retravirusurile endogene evoluează foarte lent, comparativ cu cele exogene (infecţioase).

Marea diversitate a ribovirusurilor se explică prin mutabilitatea accentuată şi adaptabilitatea lor. Cu puţine excepţii, virusurile capabile să infecteze insecte şi animale superioare sau insecte şi plante, au genom ARN. Adaptabilitatea quasispeciilor le permite deplasarea între diverse medii selective. Foarte adesea, numai una sau câteva schimbări mutaţionale permit unui virus să dobândească virulenţă, să-şi schimbe tropismul şi să devină rezistent la un medicament antiviral sau la anticorpii specifici.

Variaţiile secvenţei de baze a quasispeciilor pot influenţa severitatea infecţiei virale. Faptul este extrem de important pentru cercetători şi pentru clinicieni, care tind să considere virusul rujeolic, HIV, virusul hepatitei C sau polio, ca entităţi infecţioase unice, la care diferiţii pacienţi răspund diferit. Se ignoră natura fundamentală a ribovirusurilor, adică mutabilitatea lor accentuată, materializată în existenţa quasispeciilor.

Heterogenitatea quasispeciilor, caracterul tranzitoriu, întâmplător, nedeterminat şi imprevizibil al apariţiei lor, creează o genetică aleatorie, contraintuitivă. Baza ubicvităţii ribovirusurilor este chiar heterogenitatea lor genetică.

Existenţa quasispeciilor ridică probleme insurmontabile controlului majorităţii infecţiilor cu ribovirusuri, prin intermediul vaccinurilor. Vaccinarea a avut succes pentru unele viroze (produse de virusul polio, rujeola, oreionul), deoarece anumiţi epitopi antigenici ai proteinelor virale, au o probabilitate mică de a se modifica, fără să compromită infecţiozitatea lui.

Identificarea epitopilor stabili (sau puţin variabili) şi imunizanţi (stimulatori ai răpunsului imun protector) pentru alte ribovirusuri (FMDV, HIV_1, virusul hepatitei C) pune probleme dificile datorită naturii efemere a quasispecilor.

Cele mai multe virusuri ARN, suferă o divergenţă evolutivă, prin substituţia bazelor cu o rata de $1/10^2$-10^4/nucleotide/an.

Rata evoluţiei virusurilor nu este constantă.

Apariţia unor noi ribovirusuri în viitor, este o certitudine. Unele apariţii se vor datora contactului omului cu virusuri "vechi" de la animalele junglei neexplorate, iar altele vor apărea prin recombinare, reasortare sau prin mutaţie. Apariţia este însă condiţionată de evoluţia rapidă a quasispeciilor şi de capacitatea lor de adaptare rapidă la gazda umană. Adaptarea rapidă va determina transmiterea epidemică sau pandemică la om, aşa cum se întâmplă cu influenza A, HIV_1, sau va implica omul ca o gazdă sporadică (virusul febrei hemoragice etc.).

Este foarte probabil ca majoritatea ribovirusurilor umane, să fi evoluat în ultimele mii sau zeci de mii de ani, dar unele sunt mult mai recente.

După Brown (1989), virusurile "noi" au evoluat din interacţiunile genelor cromosomale, cu elemente genetice mobile şi cu virusurile "vechi" şi din acest punct de vedere, evoluţia virusurilor este un proces care nu se termină niciodată.

După Botstein (1981), produsul evoluţiei virale nu este un virus anume, ci o familie de elemente genetice denumite *module*, fiecare dintre ele purtând o funcţie biologică particulară. Fiecare virus este rezultatul unei combinaţii favorabile de module. Recombinarea genetică furnizează noi variante de module, din care se perpetuează cele mai adaptate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

NOȚIUNI DE GENETICĂ BACTERIANĂ

GR. MIHĂESCU, CAMELIA MIHĂESCU

Organizarea funcțională a genomului bacterian

Genetica microorganismelor este un domeniu recent al Microbiologiei și al Geneticii, deoarece a existat ideia preconceptă că bacteriile nu sunt un material adecvat pentru astfel de studii. Studiile premergătoare cercetărilor de genetică moleculară sunt cele referitoare la bacteriofag (Twort, 1915, d'Herelle, 1917), dar în special studiile lui Griffith (1928), asupra transformării genetice la pneumococ.

Microorganismele au fost redescoperite pentru studiile de genetică moleculară în anii '40, când Avery și colaboratorii au demonstrat că ADN este substratul informației genetice. S-au descris apoi mecanismele de transfer de material genetic la bacterii, s-au descoperit virusurile temperate (λ și *Mu*) și ulterior, *plasmidele*.

Un rol esențial în dezvoltarea geneticii microorganismelor l-a avut "grupul fag", condus de M. Delbrück. Studiile referitoare la relația de tip lizogen dintre virusul temperat λ și bacteria *E. coli* au contribuit decisiv la fundamentarea biologiei moleculare și la înțelegerea mecanismului transformării maligne a celulelor animale, sub acțiunea virusurilor oncogene ARN. Microorganismele sunt foarte mult utilizate în studiile de genetică din mai multe motive:

- genomul bacterian și viral au organizare foarte simplă față de genomul celulei eucariote, iar din punct de vedere chimic, este format exclusiv din acizi nucleici;
- bacteriile sunt *haploide*, ceea ce favorizează studiile de genetică, deoarece o mutație odată apărută se exprimă fenotipic imediat;
- ritmul de creștere foarte rapid al microorganismelor, permite ca într-un interval foarte scurt să se poată urmări evoluția unui număr foarte mare de generații.
- microorganismele folosite în studiile genetice au necesități nutritive simple și pot fi cultivate pe medii sintetice. Se pot astfel urmări modificările chimice pe care le produc în mediul de creștere, dependența lor de substanțele nutritive, capacitatea lor de a utiliza anumite substraturi;
- la microorganisme s-a demonstrat existența mecanismelor de transfer de material genetic și a fenomenelor de recombinare genetică, care pot fi studiate mult mai ușor decât la celula eucariotă;

Informația genetică *esențială* este reprezentată de cromosomul bacterian. În raport cu funcțiile îndeplinite, în structura sa se intâlnesc mai multe tipuri de determinanți genetici:

1) *Genele structurale*, care reprezintă circa 90% din cantitatea informației genetice, determină structura primară a proteinelor, respectiv secvența aminoacizilor în lanțul polipeptidic. Ele sunt grupate, de regulă, în unități de exprimare coordonată (transcriere sincronă), denumite *operoni*, împreună cu genele reglatoare. Uneori, ansamblul genelor supuse unui control unitar sunt dispersate în genom și formează împreună un *reglon*.

2) *Genele reglatoare* au funcția de a controla activitatea genelor structurale, prin intermediul produsului lor de sinteză (*represor* sau *aporepresor*).

3) *Regiunea operator* reprezintă segmentul de ADN cromosomal din structura fiecărui operon, care are rolul de *receptor de semnale*. Ele înregistrează prezența substanțelor cu funcție de represor sau de inductor în mediu și asigură funcționarea coordonată a operonului.

4) *Regiunea promotor* (inițiator) reprezintă un fragment din structura operonului, adiacent genei operator. Are funcția de inițiere a transcrierii operonului, în molecula de ARNm. La nivelul său are loc legarea enzimei efectoare, *ARN-polimeraza*.

5) *Secvențele de inserție (SI)* sunt secvențe nucleotidice scurte (800-1400 nucleotide), caracterizate printr-o mare mobilitate care decurge din capacitatea lor de *transpoziție*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transpoziţia este termenul aplicat rearanjărilor ADN, în care o secvenţă de nucleotide se eliberează prin excizie din situsul lor de inserţie cromosomală sau plasmidială şi se reinseră la un alt situs pe aceiaşi sau pe o altă moleculă de ADN.

6) *Gene pentru sinteza ARNr* (10-20) şi *ARNt* (circa 50), situate în regiuni diferite ale cromosomului. Cromosomul conţine deasemenea, secvenţele "ori" care controlează replicarea, precum şi *suprafeţe de legare cu mezosomul.*

Plasmidele

Plasmidele sunt structuri genetice separate fizic de cromosomul bacterian, capabile de replicare independentă de cromosom, adică entităţi cu capacitate de replicare autonomă sau *repliconi.* Ele conţin informaţie genetică neesenţială pentru creşterea şi diviziunea celulei, care poate fi câştigată sau pierdută fără ca existenţa celulei sa fie afectată. Autonomia lor faţă de cromosom este relativă: sunt separate fizic de cromosom, dar în ceea ce priveşte replicarea, sunt permanent controlate de gene cromosomale.

In categoria plasmidelor tipice intră factorii genetici *F, Col, R, Tox* etc., care probabil au o răspândire universală în lumea bacteriilor. S-au izolat peste 1000 de tipuri de plasmide diferite, prezente în mod natural, în special la bacteriile Gram negative.

Clasificarea plasmidelor

Plasmidele se denumesc şi se clasifică după efectul lor cel mai evident asupra celulei (conferirea proprietăţii de donor de material genetic, sinteza de colicine, rezistenţă la antibiotice etc.). Acest criteriu de clasificare nu este satisfăcător, deoarece, uneori o plasmidă conferă mai multe proprietăţi celulei în care se găseşte: de exemplu, plasmida R îi conferă rezistenţă la antibiotice, dar în acelaşi timp celula poate dobândi şi calitatea de donor de material genetic. Din acest motiv se folosesc şi alte criterii de clasificare.

Plasmidele se grupează după criteriul "incompatibilităţii" lor, adică al capacităţii de a exclude din celulă alte plasmide cu aceiaşi secvenţă de baze, sau una foarte apropiată. Altfel spus, plasmidele cu acelaşi tip de informaţie genetică sunt incompatibile, adică nu pot coexista într-o celulă.

In funcţie de capacitatea lor de a media transferul de material genetic prin conjugare, plasmidele se împart în două categorii.

1. *Plasmidele conjugative* (transmisibile sau infecţioase), denumite şi factori de sex, sunt acelea care conferă celulei purtătoare de plasmidă, proprietatea de donor de material genetic (celula "mascul"), în raport cu o celulă care nu posedă o astfel de plasmidă şi care se comportă ca receptor (celulă "femelă"). Plasmidele conjugative se mai numesc *conjugoni, factori de fertilitate sau transferoni.* Ele au în structura genetică, pe lângă genele de replicare autonomă, determinanţii genetici de *transfer (tra).* Din această categorie fac parte plasmidele de sex (*F, F', Hfr*), plasmidele *Ent,* unele plasmide *Col* şi unele plasmide *R.* Plasmidele conjugative au cel puţin 30 kbp.

2. *Plasmidele neconjugative* nu sunt autotransmisibile deoarece nu conferă celulei purtătoare proprietatea de donor de material genetic, neavând determinanţii genetici "tra". Din această categorie fac parte celelalte plasmide *Col* şi *R.* Ele se pot transfera de la o celulă la alta, fie prin intermediul unui fag transductor, fie prin procesul de conjugare iniţiat de o plasmidă conjugativă, coexistentă în aceiaşi celulă.

După criteriul capacităţii lor de a se integra în cromosomul celulei, se disting două categorii de plasmide.

1. *Plasmidele episomale* (*episom* = corp adăugat) sau integrative pot exista în celulă, atât în stare autonomă (fizic independentă) de cromosom, fie în stare integrată în cromosomul bacterian. Din această categorie fac parte plasmidele *F* şi *Col* E_1. Cele două stări sunt reversibile şi alternative: după integrare în structura cromosomului, ele pot trece din nou în stare autonomă şi redevin fizic independente, printr-o excizie corectă, sau printr-o excizie incorectă, când plasmida se desprinde din inserţia cromosomală împreună cu câteva gene ale acestuia.

2. *Plasmidele neintegrative* nu se integrează în cromosomul bacterian, ci persistă indefinit numai în stare autonomă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Structura moleculară a plasmidelor

Plasmidele sunt cromosomi miniaturali (minicromosomi) alcătuiţi din molecule de ADN dublu catenare, circulare, închise covalent, care reprezintă 1-2% din mărimea cromosomului. O plasmidă poate să conţină una sau câteva sute de gene. ADN plasmidial se găseşte în celulele bacteriene în trei forme fizic diferite.

1. Forma *circulară închisă* covalent (denumită C C C)(*C*ovalently *C*losed *C*ircular), care prezintă în plus 1-2 torsiuni ce dau moleculei aspectul de suprahelice.

2. Forma *circulară deschisă*, având o catenă deschisă şi una închisă.

3. Plasmidele *concatemere* sau oligomere concatenate, sunt complexe supramoleculare formate din câteva plasmide şi sunt rezultatul unor erori de replicare a monomerilor circulari sau a proceselor de recombinare interplasmidială. Dacă ambele catene sunt închise, componentele individuale ale complexului sunt suprahelicale, iar dacă una din catene este deschisă, forma este circulară. Configuraţia circulară este o condiţie a existenţei lor în celulă, cea care le conferă rezistenţă la acţiunea nucleazelor celulare. Totuşi, s-au identificat plasmide cu configuraţie lineară (la *Streptomyces, Rhodococcus*).

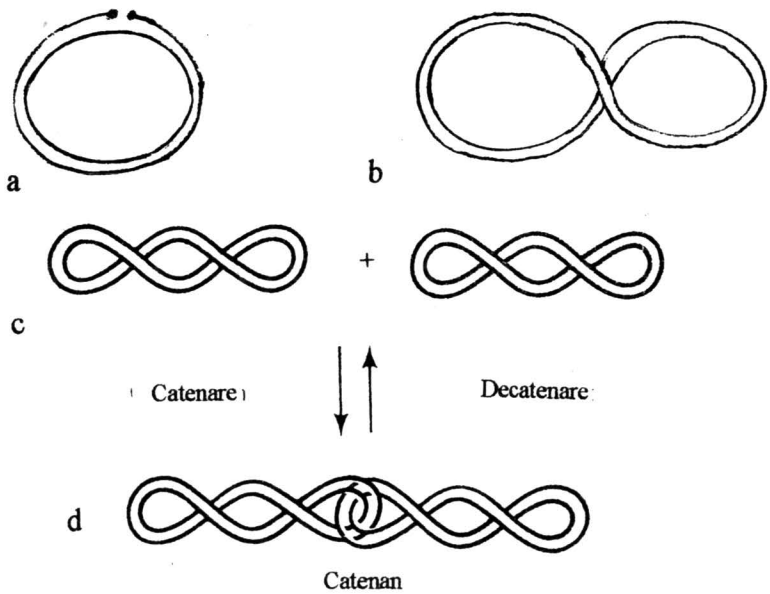


Fig. 199. Diferite configuraţii ale ADN plasmidial. a. Plasmidă circulară cu o catenă incizată. b, c. Plasmide covalent închise superhelicale. d. Plasmide concatenate.

Structura genetică şi funcţiile plasmidelor

Plasmidele conţin următoarele categorii de determinanţi genetici:

1. Gene *esenţiale* pentru existenţa lor ca repliconi fizic independenţi, adică genele implicate în replicarea acestor structuri genetice.

2. Gene de specificitate pentru *incompatibilitate*. Incompatibilitatea corespunde situaţiei în care, două plasmide omologe nu pot fi menţinute stabil în aceiaşi celulă, deoarece una o exclude pe cealaltă. Tehnica hibridării ADN-ADN evidenţiază o omologie netă între plasmidele din acelaşi grup de incompatibilitate şi o foarte mică asemănare între plasmidele compatibile. Pe baza incapacităţii de a coexista în aceiaşi celulă, plasmidele au fost grupate în *grupe de incompatibilitate.*

3. Gene *structurale*, în număr variabil, care conferă celulei proprietăţi noi.

4. *Suprafaţa de legare* de mezosomi, care asigură corelarea replicării plasmidelor cu ciclul celular, precum şi repartizarea lor echilibrată în cele două celule fiice.

5. *Elemente genetice transpozabile* (secvenţe de inserţie şi transpozoni).

6. Plasmidele conjugative au *determinanţi genetici de transfer* (tra).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Plasmidele au dimensiuni variate: 1 – 400 kb (echivalentul a 10% din cromosomul de *E. coli*). Cele mai mici au ADN echivalent pentru 2-3 gene. Genele plasmidiale nu conferă un fenotip detectabil celulei purtătoare şi de aceea se numesc *gene criptice*.

Prezenţa plasmidelor conferă celulelor purtătoare, proprietăţi noi, concretizate într-o gamă largă de funcţii, dintre care, cele mai importante sunt următoarele:

- rezistenţa la una sau mai multe grupe de antibiotice (ampicilina, streptomicina, tetraciclina, kanamicina etc.) şi la sulfamide;
- rezistenţa la cationii metalelor grele (la ionii de Hg^{2+} şi combinaţiile sale orgnomercurice, la ionii de Ni, Co, Pb, Cd, Zn, Ag, At);
- rezistenţa la anioni: arseniat, arsenit, telurit, borat, cromat;
- rezistenţa la alţi compuşi (acridină, etidiu, care se intercalează între baze) şi la radiaţiile UV;
- proprietăţi noi de biosinteză: sinteza antibioticelor şi bacteriocinelor;
- proprietăţi metabolice noi: metabolismul unor glucide simple (lactoza, sucroza, rafinoza), al compuşilor complecşi (octan, toluen, camfor, 2,4-diclor-toluen), al proteinelor (caseina, gelatina);
- producerea de toxine (enterotoxina la *E. coli*, toxina exfoliativă la *Staphylococcus aureus*, neurotoxina la *Clostridium tetani*) şi prin ele, proprietăţi noi de virulenţă;
- sinteza antigenelor de colonizare la *E. coli* (antigenele K_{88} şi K_{99});
- sinteza materialului capsular la *B. anthracis*;
- inducerea tumorilor de colet la plante (plasmidă *Ti* la *A. tumefaciens*) şi sinteza de către celulele tumorii, a derivaţilor azotaţi din aminoacizi, denumiţi *opine* (octopina, derivat al argininei şi nopalina);
- infecţia şi nodularea plantelor leguminoase (plasmida *Sym* la *Rhizobium*);
- proprietăţi conjugative: plasmide ce codifică sinteza pilinei şi asamblarea pililor (şi implicit dobândirea sensibilităţii la fagii ARN masculi, care se leagă specific de pili);
- alte proprietăţi: formarea vacuolelor cu gaz la *Halobacterium*, variaţia translucid/opac a coloniilor de *Mycobacterium*, producerea H_2S la *Enterobacteriaceae*.

Controlul numărului de copii plasmidiale

Într-o celulă bacteriană se găseşte un număr diferit de copii plasmidiale: una – câteva/celulă, sau un număr de 10-100 copii. Numărul diferă în funcţie de tipul de control pe care îl exercită cromosomul asupra replicării plasmidelor, de starea fiziologică a celulei, de dimensiunile plasmidelor, dar, în esenţă, numărul de copii se reglează prin controlul ratei de iniţiere a sintezei ADN. Dacă o celulă este transformată cu o plasmidă ce se află într-un număr mic de copii în celula de origine, ea se va replica odată sau de două ori înainte de diviziunea celulei. Dacă transformarea se face cu o plasmidă, care în celula de origine se găseşte într-un număr mare de copii, ea se va replica în mod repetat până este atins numărul caracteristic de copii.

Explicaţia acceptată pentru reglarea numărului de copii este următoarea: plasmida codifică *un inhibitor*, cu rol reglator negativ (inhibitor) asupra iniţierii replicării. Activitatea inhibitorului este dependentă de concentraţie. Pe măsură ce celula creşte, concentraţia de inhibitor scade şi replicarea nu mai este inhibată. După replicare, numărul moleculelor de ADN plasmidial se dublează. In acelaşi timp, se dublează şi numărul de gene codificatoare ale sintezei inhibitorului. Prin sinteză proteică, concentraţia inhibitorului se dublează. Consecinţa este stoparea replicării.

Secvenţa de evenimente este aceiaşi pentru cazul în care transformarea celulei s-a făcut cu o plasmidă ce realizează un număr mare de copii/celulă. Probabil că, pentru plasmidele care se găsesc în număr mare de copii/celulă, efectul inhibtor necesită o concentraţie mai mare a factorului inhibitor, decât în cazul plasmidelor cu un număr mic de copii.

Amplificarea numărului de copii plasmidiale/celulă, semnifică creşterea majoră a numărului de copii, în raport cu situaţia obişnuită. Amplificarea este consecinţa tratamentelor chimice sau a manipulărilor genetice ale celulei bacteriene. Faptul este extrem de util în

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

domeniul ingineriei genetice celulare cu scopuri biotehnologice. Se creează posibilitatea ca o genă utilă, transferată artificial sau existentă în mod natural în structura plasmidei, să realizeze un număr mare de copii/celulă şi sinteza unui anumit produs, cu o rată corespunzator mai înaltă. De exemplu, sinteza catalazei poate fi amplificată de până la 25 de ori.

Incompatibilitatea plasmidelor

Cuplurile de plasmide strâns înrudite nu pot fi menţinute stabil în descendenţa unei celule, deoarce sunt incompatibile. Faptul este explicabil prin *modelul inhibitorului*, a cărui concentraţie este esenţială pentru iniţierea replicării. De exemplu, o celulă care conţine două plasmide, F şi Col E_1 sintetizează inhibitori diferiţi. Replicarea fiecărui tip de plasmidă se va desfăşura independent, deoarece inhibitorul unei plasmide nu reglează replicarea celeilalte. Astfel, plasmidele *F* şi *Col* E_1 sunt compatibile şi aparţin unor grupe diferite de incompatibilitate.

Invers, două variante ale aceleiaşi plasmide nu pot fi menţinute stabil în aceiaşi celulă, adică sunt incompatibile. Explicaţia constă în faptul că, fiecare plasmidă codifică sinteza propriului inhibitor de replicare, care este activ nu numai asupra repliconului codifcator ci şi asupra celuilalt replicon. Astfel, numărul moleculelor plasmidiale în celulă, este menţinut la un nivel inferior sumei copiilor celor două plasmide.

Plasmidele cu sisteme neînrudite de control al replicării sunt compatibile. Ele aparţin unor grupe diferite de incompatibilitate, iar cele incompatibile aparţin aceluiaşi grup.

Eliminarea plasmidelor

Eliminarea plasmidelor din celulă sau procesul de "vindecare" se poate realiza spontan sau cu o frecvenţă superioară, prin tratarea celulelor cu anumite substanţe care interferă selectiv cu replicarea lor, fără să modifice dinamica replicării cromosomului. Pierderea plasmidelor nu afectează viabilitatea celulei, datorită caracterului neesenţial al informaţiei lor genetice. Eliminarea plasmidelor este realizată cu oarecare eficienţă de acriflavină, rifampicină, bromura de etidiu, ionii de cobalt. Unii agenţi chimici au acţiune selectivă, fiind foarte eficienţi pentru eliminarea unor plasmide (acridina elimină plasmida F), fără să afecteze pe altele. Din punct de vedere practic, acţiunea selectivă este importantă, în primul rând pentru eliminarea plasmidelor de rezistenţă la antibiotice. Selectivitatea acţiunii unor agenţi chimici se explică prin compoziţia diferită în baze, a plasmidelor faţă de cromosom. Quinolonele sunt recunoscute pentru eficacitatea lor ca agenţi de eliminare a plasmidelor, dar nu există nici un agent chimic de "vindecare" a tuturor plasmidelor.

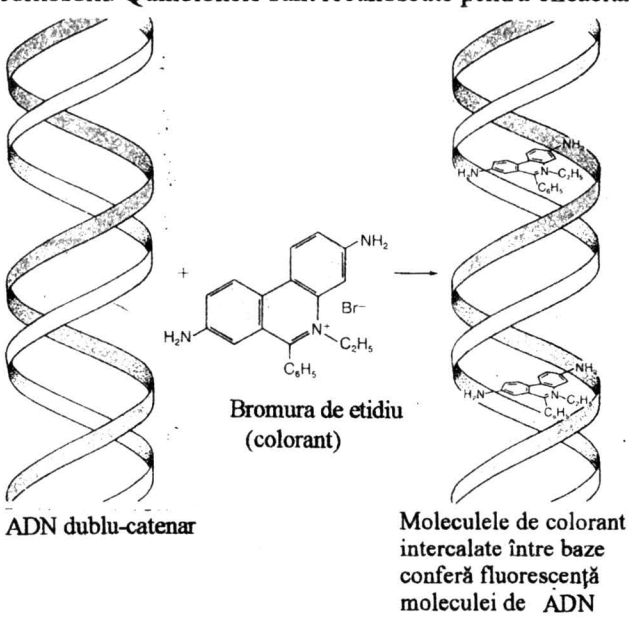


Fig. 200. Bromura de etidu se intercalează între bazele ADN (după Brock, 1988).

Replicarea plasmidelor

Plasmidele au o regiune esenţială ce conţine genele imlicate în replicare şi care, teoretic sunt singurele gene obligatorii ale unei plasmide. In regiunea esenţială a unei plasmide sunt concentrate câteva gene şi secvenţe:

- originea replicării (ori), caracteristică fiecărui replicon;
- gena codificatoare a proteinei de iniţiere a replicării denumită *proteina Rep*, existentă la multe plasmide;
- secevenţele cu rol în controlul replicării.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

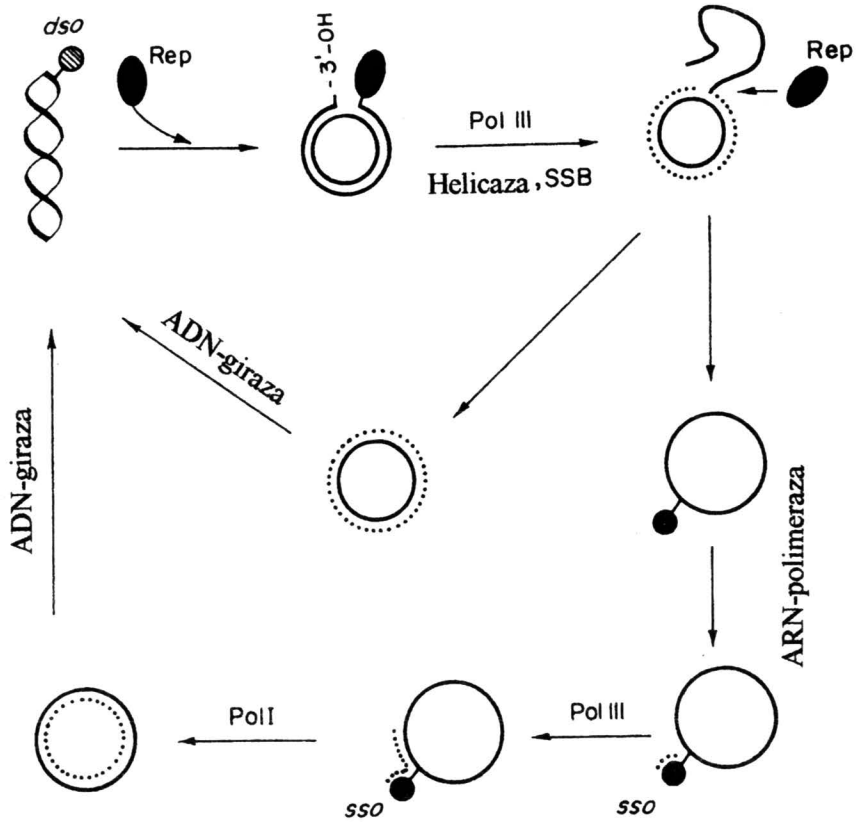


Fig. 201. Replicarea plasmidelor după modelul "cercului rotativ". Proteina *rep* codificată de plasmidă recunoaşte originea dublu catenară (*dso*) a ADN suprahelical şi produce o clivare la situs specific, generând un capăt 3'OH. Capătul 3'OH este alungit de proteinele de replicare, iar catena parentală este dislocată. Când bifurcaţia de replicare ajunge la situsul *dso*, proteina Rep catalizează o reacţie de transfer a catenei, eliberând un intermediar monocatenar de ADN şi o moleculă dublu catenară, cu o catenă parentală şi una nou sintetizată (cercul punctat). Pe molecula circulară monocatenară este iniţiată sinteza catenei lagging, la situsul monocatenar de origine (sso), catalizată de ARN-polimerază. Enzima va sintetiza un primer scurt de ARN, iar sinteza catenei lagging este catalizată de ADN-polimerază. Produsele sintezei sunt două molecule de ADN suprahelicale (după Bennett, 1998).

Plasmidele se replică fizic autonom faţă de cromosomul bacterian, dar funcţional, replicarea este total sau parţial dependentă de proteinele codificate de genele cromosomale. Majoritatea plasmidelor sunt circulare. Plasmidele lineare s-au găsit la bacteriile Gram pozitive şi Gram negative.

Plasmidele circulare se replică semiconservativ şi îşi păstrează forma circulară pe toată durata ciclului replicativ. Cel mai adesea replicarea se face după modelul *cercului simplu* (replicare theta) sau după modelul *cercului rotativ*.

Replicarea după modelul cercului simplu începe la un punct denumit originea replicării (*ori*), prin incizia ambelor catene. De cele mai multe ori, iniţierea replicării necesită o proteină iniţiatoare, codificată de plasmidă (proteina *Rep*). Proteina *Rep* recunoaşte specific şi se asociază cu secvenţa de origine a replicării. Regiunea *ori* conţine secvenţe de baze repetate în ordine directă, denumite *iteroni*. Iteronii sunt esenţiali nu numai pentru replicare, dar şi pentru controlul replicarii. Cele două catene, după incizie au rolul de matriţe pentru sinteza catenelor noi. Bifurcaţia de replicare se deplasează uni- sau bidirecţional. Ambele catene se replică simultan.

Replicarea după modelul "cercului rotativ" este unidirecţională, deoarece sinteza celor două catene este decalată în timp. Proteina *Rep* creează o breşă la secvenţa *dso* (*d*ouble *s*trând *o*rigin) şi generează gruparea 3'OH, cu rol de primer terminal. Capătul 3'OH al catenei de polaritate negativă, are rol de primer pentru sinteza catenei "leading", fiind alungit prin polimerizare pe catena circulară de polaritate opusă, cu rol de matriţă. Catena "negativă" este îndepărtată, pe măsură ce replicarea progresează. Alungirea capătului 3'OH al catenei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

"negative", continuă până când complexul enzimatic de replicare (replisomul) a parcurs întregul cerc al matriţei "pozitive". După ce întreaga catenă circulară "pozitivă" a fost copiată într-o catenă complementară, proteina *Rep* catalizează reacţia de legare a extremităţilor şi catena "negativă" este circularizată. Astfel, într-o primă etapă, din procesul replicării, rezultă o moleculă circulară dublu catenară şi catena "negativă" parentală, deasemenea circulară. Catenă "negativă" circulară este ulterior convertită la molecula dublu catenară, pornind de la o origine proprie a replicării. Mecanismele de replicare a plasmidelor sunt comune şi pentru replicarea genomului unor dezoxiribovirusuri.

Unele dovezi experimentale sugerează că replicarea plasmidelor este iniţiată de proteine de replicare, distincte de cele care iniţiază replicarea cromosomului. De exemplu, cloramfenicolul (sau un alt inhibitor al sintezei proteice) inhibă iniţierea replicării ADN cromosomal, dar nu a ADN plasmidial. Numărul de plasmide/celulă creşte la circa 1000. Replicarea plasmidelor continuă după inhibiţia replicării ADN cromosomal, deoarece ele utilizează proteine de replicare stabile sau proteine codificate de plasmide, stabile la acţiunea agenţilor chimici.

Distribuţia plasmidelor în procesul diviziunii celulare

Replicarea este o condiţie necesară, dar nu suficientă pentru menţinerea plasmidelor în celula bacteriană. Prin diviziune, fiecare din cele două celule fiice trebuie să dobândească cel puţin o copie a plasmidei.

Pentru plasmidele mari, cu un număr mic de copii/celulă (plasmidă F şi unele plasmide R), distribuţia este un proces *activ*, care implică funcţii codificate de plasmidă. Mecanismul distribuţiei active este necunoscut. Se presupune că o secvenţă de câteva sute de baze, echivalentă unui *centromer* primitiv, împerechează plasmidele înainte de diviziune. Această secvenţă, împreună cu una sau mai multe proteine, codificate de plasmidă sau de cromosom formează sistemul de distribuţie sau de *partiţie*. Sistemul poate orienta asocierea plasmidelor de membrană sau lângă zona de formare a septului de diviziune. Incompatibilitatea funcţionează şi la acest nivel: plasmidele asemănătoare au acelaşi sistem de distribuţie şi se repartizează dezechilibrat în cele două celule fiice.

Plasmidele mici nu au sisteme de distribuţie activă. Distribuţia lor în celulele fiice este întâmplătoare. Ele realizează un număr mare de copii/celulă (30-40), astfel încât şansa ca o celulă fiică, să nu primească nici o copie plasmidială, este foarte mică.

Recombinarea plasmidelor

Recombinarea este definită de proprietatea plasmidelor de a se asocia prin mecanisme genetice, cu alţi repliconi: cu cromosomul bacterian sau cu alte plasmide. Recombinarea este o proprietate limitată numai la plasmidele care au capacitate integrativă. Ca urmare a acestei proprietăţi, ele trec reversibil de la starea fizic autonomă, la cea integrată.

Plasmidele cu funcţii episomale se pot integra reversibil, atât în cromosomul bacterian, cât şi într-o altă plasmidă existentă în celulă. Integrarea în structura cromosomului este precedată de secţionarea ambelor structuri genetice, sub acţiunea unei nucleaze, urmată de reunirea lor prin extremităţile libere, într-o singură moleculă circulară. Consecutiv recombinării, plasmida nu se mai replică autonom, ci numai sincron cu ceilalţi determinanţi genetici cromosomali.

Recombinarea genetică plasmidă-plasmidă se face prin acelaşi mecanism molecular al integrării plasmidă-cromosom şi este deosebit de important prin consecinţele sale. Fenomenul stă la baza formării plasmidelor mari, cu rol de conjugon, ca şi la baza acumulării pe aceiaşi plasmidă, a unui număr mare de gene structurale, care conferă, fiecare în parte, rezistenţă la un antibiotic diferit.

Integrarea recombinatorie a plsmidelor este un proces reversibil. Printr-un proces de excizie (invers celui de recombinare), plasmidele se desprind din inserţiile structurii genetice în care au fost integrate şi revin la starea fizic autonomă. Excizia poate fi corectă, cu exactitate de la situsurile de integrare, astfel încât plasmida redevenită autonomă, este identică cu cea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

dinainte de integrare. Uneori, excizia este incorectă, caz în care, plasmida schimbă cu cromosomul, prin procese de recombinare, o secvenţă de nucleotide. Plasmida recombinată este modificată: a pierdut o parte din determinanţii genetici proprii, dar a câştigat o secvenţă echivalentă, de origine cromosomală.

Plasmidele F

Plasmidele F (*F*ertility), denumite şi plasmide de sex sunt unităţi genetice extracromosomale cu proprietăţi episomale şi funcţie de conjugon. Prototipul plasmidelor de fertilitate este cel descris la *E. coli* K_{12}, prezentă într-un singur exemplar/celulă bacteriană, datorită sincronizării replicării sale cu replicarea cromosomului. Mărimea sa este apreciată la 94,5 kbp, distribuite în 4 regiuni distincte:

- regiunea genelor de incompatibilitate (*inc*) şi a celor implicate în replicare (*rep*);
- regiunea care cuprinde cele patru elemente genetice transpozabile (trei secvenţe de inserţie (IS) şi transpozonul Tn 1000;
- regiunea "liniştită", cuprinsă între IS_2 şi *inc-rep*;
- regiunea *tra*, care cuprinde secvenţele *ori T* (de origine a transferului) şi încă cel puţin 28 de gene structurale ale plasmidei.

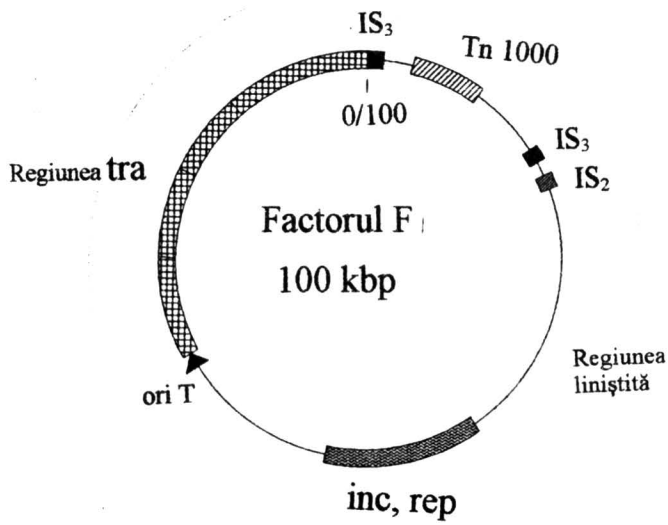


Fig. 202. Harta genetică a factorului F de la *E. coli*. Amănunte în text.

Plasmidele F se replică fizic autonom, dar sincron cu cromosomul bacterian, datorită unei strânse asocieri fizice cu acesta.

In funcţie de prezenţa plasmidelor de sex F, de raportul lor cu cromosomul bacterian şi de mecanismul în care este mediat transferul de material genetic, celulele bacteriene se pot grupa în patru categorii distincte:

1. Celulele F^-, lipsite de factorul F, echivalente fiziologic unor celule "femele", care se comportă ca receptoare de material genetic.

2. Celulele F^+ poartă plasmide F autonome şi sunt fiziologic echivalente unor celule "mascule" sau donoare de material genetic, fiind capabile sa transfere o copie a plasmidei F, în timpul conjugării.

3. Celulele Hfr posedă plasmida F integrată în cromosom. Fiziologic, sunt considerate ca având caracter de "supermascul", deoarece se comportă ca donoare de material genetic, realizând procese de conjugare şi recombinare cu o frecvenţă mare.

4. Celulele F' sunt purtătoare ale unei plasmide F recombinată, care a încorporat în structura sa, şi gene ale cromosomului bacterian în care a fost iniţial integrată şi din care a trecut în stare autonomă, printr-un proces de excizie eronată. Aceste celule au caracter "mascul" şi se comportă ca donoare de material genetic (transferă factorul F').

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Plasmidele R

Plasmidele R (de rezistenţă transmisibilă, cu caracter infecţios), descrise de Watanabe (1960), sunt elemente genetice extracromosomale care conferă celulei purtătoare, rezistenţă simultană la mai multe antibiotice, la sulfamide, la cationii metalelor grele. El a demonstrat rezistenţa simultană a celulelor de *Shigella* (agentul dizenteriei, bacterie Gram negativă, enterică), la mai multe antibiotice, iar rezistenţa s-a dovedit a fi transmisibilă la celule sensibile.

Plasmidele R conţin informaţia genetică ce conferă rezistenţă la mai multe antibiotice, la sulfamide (produşi de sinteză chimică, derivaţi ai acidului paraaminobenzoic) şi la diferiţi agenţi chimici. Datorită înrudirii chimice dintre diferite familii de antibiotice, o plasmidă conferă rezistenţă simltană, la un număr mare de antibiotice. Astfel, celula bacteriană devine suprarezistentă, atât calitativ cât şi cantitativ. Datorită rezistenţei plasmidiale, bacteriile patogene produc infecţii foarte greu de controlat prin mijloacele terapeutice obişnuite.

Plasmidele R au fost evidenţiate la *E. coli, Proteus, Salmonella, Pseudomonas, Erwinia, Yersinia, Staphylococcus, Streptococcus, Clostridium etc.*

Plasmidele R au o structură genetică complexă şi sunt alcătuite din următoarele categorii de determinanţi genetici:

- genele care conferă rezistenţă la antibiotice (genele "r");
- genele care conferă plasmidei R, funcţia de conjugon (transferon). Ele sunt grupate într-un transpozon, formând factorul de transfer al rezistenţei (FTR). Se numesc gene *tra* şi codifică sinteza proteinelor necesare transferului plasmidei prin conjugare;
- secvenţe de inserţie;
- secvenţa de iniţiere a procesului de replicare ("ori");
- genele ce asigură replicarea fizic autonomă, a plasmidei.

Genele "r " fac parte din structura unor transpozoni (fiind delimitate de secvenţe de inserţie) şi au o mobilitate foarte accentuată, adică se deplasează dintr-un situs în altul în structura plasmidei sau între plasmidă şi cromosom. Numărul genelor de rezistenţă într-o plasmidă este variabil. Spre deosebire de plasmidele F, plasmidele R nu se integrează în cromosomul bacterian.

Cele două categorii de determinanţi genetici, *de rezistenţă* şi *de transfer,* pot să existe în stare recombinată sau se găsesc disociaţi în celula bacteriană, ca unităţi de sine stătătoare; *factorul de transfer al rezistenţei* (FTR) ce poartă gene reglatoare ale replicării, genele de transfer şi uneori gena de rezistenţă la tetraciclina (tet), cu greutatea moleculară de 11 x 10^6 D; celălalt component, care conţine *genele de rezistenţă la antibiotice* şi are dimensiuni foarte diferite, de la câteva milioane până la 100 milioane D. Cele două plasmide mici se replică autonom.

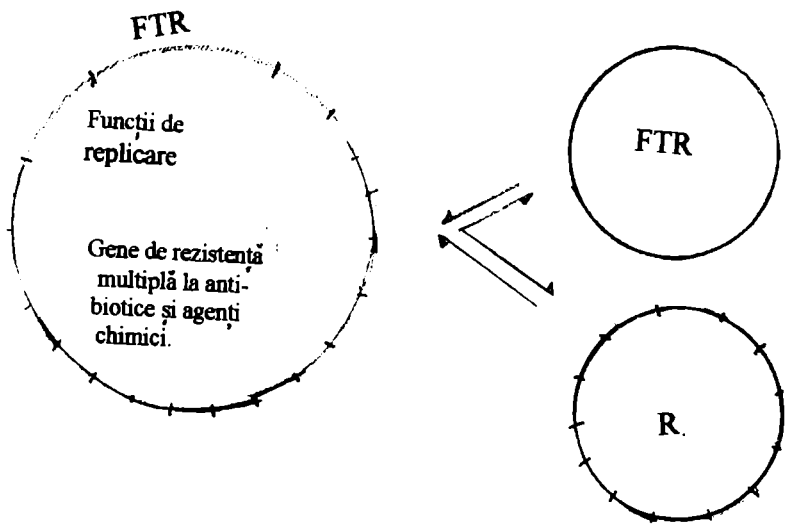


Fig. 203. Harta genetică a unei plasmide R, cu gene de rezistenţă la diferite antibiotice şi la diferiţi agenţi chimici cu efect antibacterian. Unele plasmide R conţin factorul de transfer al rezistenţei (FTR). Schema ilustrează disocierea şi reasocierea factorului de transfer (FTR) cu determinanţii genetici de rezistenţă (după Rownd şi colab., 1974).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În celulele de *E. coli*, cele două plasmide se recombină şi formează o plasmidă mare, care poartă atât genele de rezistenţă, cât şi pe cele de transfer. În această stare, plasmidă R se transmite prin conjugare cu o frecvenţă foarte mare: 100% din celulele sensibile ale unei populaţii celulare ce formează cupluri de conjugare, primesc o copie a plasmidei R şi devin rezistente (aşa numita rezistenţă infecţioasă sau transmisibilă). Frecvenţa transmiterii conjugative scade treptat, datorită sintezei unui represor care blochează activitatea genelor *tra* şi astfel este inhibată sinteza pilinei şi implicit asamblarea pililor.

Dacă plasmidă R nu conţine determinanţii genetici *tra* (FTR), transferul său se face prin transducţie mediată de un fag de dimensiuni mari, sau prin conjugare iniţiată de alte plasmide conjugative.

Rezistenţa bacteriană la antibiotice

În prezent, pentru tratamentul infecţiilor bacteriene la om şi animale, se folosesc peste 250 de agenţi antibacterieni, dar problemele clinice sunt departe de a fi rezolvate. Bacteriile prezintă o multitudine de căi prin care scapă de efectele inhibitorii ale substanţelor terapeutice şi găsesc noi modalităţi de a invada ţesuturile gazdei. Mutaţiile care conferă rezistenţă la un antibiotic, pot să inactiveze o familie întreagă de antibiotice înrudite structural. Astfel, bacteriile rezistente la o sulfamidă sau la o tetraciclină, sunt rezistente la toate sulfamidele, respectiv la toate tetraciclinele. Mai mult, bacteriile pot să posede gene de rezistenţă pentru clase neînrudite de agenţi antibacterieni, localizate pe plasmide ce pot fi uşor transferate la alte specii sau la alte genuri.

Mecanismele genetice ale rezistenţei la antibiotice

Introducerea antibioticelor şi a agenţilor chimioterapeutici în tratamentul infecţiilor a fost însoţită de creşterea permanentă în timp, a frecvenţei cu care se izolează tulpini rezistente.

Rareori, rezistenţa la antibiotice este determinată de mutaţii ale genelor cromosomale. De cele mai multe ori, rezistenţa multiplă este consecinţa dobândirii unei plasmide R.

Mecanismele fiziologice ale rezistenţei la antibiotice, consecutivă mutaţiilor unor gene cromosomale, sunt următoarele:

1. *Blocarea mutaţională a transportorului* antibioticului în celulă (şi implicit a transportului). Pentru a fi eficient, antibioticul, de cele mai multe ori, trebuie să pătrundă în celulă. Bacteriile sensibile au receptori de suprafaţă care funcţionează ca proteine de transport, având rolul de *porine* (proteine de legare). Ele leagă antibioticul la suprafaţa celulei şi îl transportă în citoplasmă. Proteinele de legare nu sunt destinate legării şi transportului antibioticului, dar acesta se substituie moleculei care este transportată fiziologic. Pe calea transportorilor membranari, antibioticul pătrunde în celulă şi îşi exercită efectul la nivelul "ţintei" specifice (ribosomi, ARN-polimeraza, ADN). Ori de câte ori structura proteinei de legare se modifică prin mutaţie, moleculele sale devin ineficiente pentru legarea şi transportul antibioticului,

2. *Modificarea structurală* a "ţintei" antibioticului. Acest mecanism este tipic pentru rezistenţă mutaţională. De exemplu, mutantele bacteriene rezistente la streptomicină, prezintă ribosomi modificaţi prin mutaţia uneia din proteinele constitutive, sau prin metilarea specifică a ARNr. Modificarea ARNr prin metilare este un mecanism foarte eficient de dobândire a rezistenţei, deoarece modifică toţi ribosomii, în timp ce o mutaţie în secvenţa ADN ce codifică una din proteinele ribosomale are efecte limitate.

Modificarea "ţintei" poate să fie rezultatul acţiunii unor determinanţi genetici plasmidiali. De exemplu, rezistenţa la eritromicină, este datorată unei enzime inductibile, codificată de o gena plasmidială, ce modifică ARNr.

3. Creşterea concentraţiei unei enzime hidrolitice prin *amplificarea numărului de copii ale genei cromosomale,* este mai puţin importantă pentru rezistenţa bacteriană, dar este foarte importantă pentru rezistenţa celulelor maligne la agenţii chimioterapeutici.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Rezistența plasmidială la antibiotice și la agenții chimioterapeutici, a celulelor bacteriene, este bine cunoscută. S-a remarcat existența unei corelații directe între prezența plasmidelor R în celulele bacteriene și rezistența multiplă la antibiotice. Eliminarea plasmidelor este urmată de redobândirea sensibilității la aceleași antibiotice.

Rezistența plasmidială la antibiotice este multiplă și are capacitatea de a se răspândi nu numai pe verticală (de la o generație celulară la alta), ci și pe orizontală, prin mecanismele de transfer genetic între diferite specii patogene, sau de la specii saprobionte la cele patogene. Nivelul rezistenței se poate modifica sub raport cantitativ, prin modificarea numărului de copii ale plasmidei. Rezistența plasmidială nu modifică rata de creștere și nici virulența tulpinilor bacteriene.

Mecanismele fiziologice ale rezistenței plasmidiale la antibiotice sunt următoarele:

1. Rezistența consecutivă *utilizării unei căi metabolice alternative*. Exemplul tipic în acest sens este rezistența la acțiunea bacteriostatică a sulfamidelor. Ele acționează prin inhibiție competitivă, având o mare capacitate de a se substitui acidului paraaminobenzoic (APAB), un precursor al acidului folic. Unele microorganisme posedă gene plasmidiale care codifică sinteza enzimelor necesare sintezei acidului folic pe o cale care ocolește APAB și astfel devin rezistente la acțiunea sulfamidelor.

2. *Inactivarea enzimatică* a antibioticului este un mecanism obișnuit al rezistenței mediată de plasmidele R. Majoritatea genelor de rezistență ale factorului R induc sinteza unor enzime cu acțiune inactivatoare directă asupra antibioticelor. De exemplu, sinteza beta-lactamazei este indusă de nivele scăzute ale antibioticelor beta-lactamice în mediu. Plasmidele R oferă posibilitatea fiziologică a amplificării genice și a sintezei unor cantități mari de enzimă inactivatoare. Prin hidroliza penicilinei, rezultă acidul peniciloic, inactiv.

Pentru a-și exercita efectul asupra "țintei", unele antibiotice necesită o sursă de adenil-fosfat sau un grup acetil. Altele se inactivează după adenilare sau acetilare. Mai rar, antibioticul se inactivează prin fosforilare (de exemplu, gentamicina).

Plasmida R induce sinteza unei enzime (streptomicin-adenil-transferază), care adenilează streptomicina și o inactivează. Cloramfenicolul este acetilat sub acțiunea enzimei inductibile cloramfenicol-acetil-transferaza, codificată de o genă plasmidială și este inactivat.

3. *Sinteza proteinelor cu rol de "pompe"* de eliminare a antibioticului. Plasmidele codifică proteine membranare cu rol în eliminarea moleculelor care pătrund prin difuzie (de exemplu, eliminarea tetraciclinei).

Alte proteine membranare conferă rezistență la diferiți compuși chimici. Ele hidrolizează compușii organici cu Hg și reduc Hg^{2+} din combinațiile organice, la Hg liber, netoxic și astfel celulele devin rezistente.

Rezistența conferită de factorul R este adaptativă și foarte eficientă pentru supraviețuirea celulei bacteriene.

Rezistența la antibiotice, mediată de factorul R, conferă bacteriilor proprietatea de a tolera concentrații mari de antibiotice, ceea ce creează mari dificultăți în terapia antiinfecțioasă. Situația este agravată de posibilitatea transferului plasmidelor prin conjugare, de la bacteriile autohtone purtătoare, la bacteriile invadatoare, chiar dacă aparțin altor genuri.

Cauzele fenomenului de rezistență la antibiotice

Plasmidele R nu au apărut ca rezultat al utilizării antibioticelor în terapia antiinfecțioasă. Ele sunt prezente în culturile bacteriene din colecții, izolate anterior erei antibioticelor. Frecvența izolării tulpinilor bacteriene din mediul spitalicesc, cu rezistență multiplă, a crescut de la 0,2% la 1958, la 58% în 1965 și 95% în 1980. Fenomenul rezistenței este într-o expansiune constantă. Utilizarea antibioticelor nu a indus apariția plasmidelor R și nici a fenomenului de rezistență, ci a determinat o *selecție continuă a tulpinilor rezistente*, ceea ce explică preponderența lor în clinica infecțioasă. Cauzele creșterii procentului de tulpini bacteriene rezistente la antibiotice sunt:

- utilizarea antibioticelor pe scară largă în clinica umană, adeseori în situații care nu impun o asemenea decizie;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- folosirea antibioticelor furajere. Acestea se găsesc în masa miceliană (de la fabricile de antibiotice), ce se administrează în hrana animalelor. Efectul este benefic, pentru că se elimină bacteriile enterice toxigene, vitaminele miceliene favorizează creşterea, dar antibioticul selectează tulpinile bacteriene rezistente.

Combaterea rezistenţei plasmidiale este posibilă pe următoarele căi:

- utilizarea raţională a antibioticelor, bazată pe observaţia că plasmidele au tendinţa să dispară, dacă mediul de viaţă nu mai exercită o presiune selectivă;
- efectuarea unei antibiograme cantitative, înainte de administrarea antibioticului;
- interzicerea pentru câţiva ani, a utilizării antibioticelor devenite ineficiente, ca urmare a selecţiei în timp, a tulpinilor rezistente;
- eliminarea selectivă a plasmidelor R, prin utilizarea unor agenţi care le inhibă selectiv replicarea;
- utilizarea unor antibiotice noi, de semisinteză.

Plasmidele "Col"

Plasmidele "Col" sunt elemente genetice extracromosomale, care codifică sinteza unor substanţe antibiotice de tip special, denumite *colicine*. Fenomenul de colicinogeneză a fost descoperit de Gratia (1925). Denumirea de "colicine" a fost atribuită unor substanţe cu proprietăţi antibiotice produse de o tulpină virulentă de *E. coli*, care au efect letal asupra celulelor producătoare, precum şi asupra unor tulpini strâns înrudite cu cea producătoare. Producerea de colicine nu este limitată la *E. coli*, ci este un fenomen mult mai răspândit în lumea bacteriilor şi din acest motiv, Jacob (1953) a dat denumirile de *bacteriocine*, *bacteriocinogeneză şi factori bacteriocionogeni*, pentru a desemna substanţele, fenomenul şi respectiv plasmidele care controlează producerea lor.

Plasmidele (factorii "Col") au aceleaşi particularităţi, comune altor plasmide: sunt molecule de ADN, circulare, dublu catenare închise, suprahelicale. La *E. coli*, în mod obişnuit se găsesc 5-25 de copii/celulă.

Unele plasmide "Col" (de exemplu, *Col* E_1) au funcţie de conjugon, deoarece poartă în structura lor genetică, determinanţii genetici de transfer. Ele se pot transfera la tulpinile col^-, prin conjugare. Plasmidele Col tra^- se transferă prin transformare genetică, transducţie fagică sau prin conjugare iniţiată de alte plasmide cu funcţie de conjugoni.

Bacteriocinele sunt substanţe antibiotice cu acţiune bactericidă, a căror sinteză este codificată de plasmidele *Col*. De cele mai multe ori, bacteriocinele sunt proteine pure, uneori sunt glicoproteine, cu o greutate moleculară de 18-90 kD.

Bacteriocinele produse de bacteriile Gram negative au câteva proprietăţi generale:

- au un spectru de acţiune foarte îngust, limitat la tulpina producătoare şi la altele strâns înrudite;
- acţiunea lor este bactericidă;
- conţin o componentă biologic-activă, de natură proteică;
- se leagă de celulele sensibile prin intermediul unor receptori celulari cu specificitate înaltă, ceea ce explică spectrul lor foarte restrâns de acţiune;
- biosinteza bacteriocinelor are efect letal asupra celulei producătoare.

Denumirile diferitelor bacteriocine provin de la numele genului sau al speciei bacteriei producătoare, la care se adaugă sufixul "cină": de exemplu, *lactocine* (produse de *Lactobacillus*), *vibriocine* (produse de *Vibrio*), respectiv *pesticine* (produse de *Yersinia pestis*), *megacine* (produse de *B. megatherium*), *subtilicine* (produse de *B. subtilis*) etc.

Bacteriocinele produse de bacteriile Gram pozitive au un spectru de acţiune foarte larg. Ele sunt active asupra celulelor producătoare, dar şi asupra unor specii mai îndepărtate şi chiar asupra bacteriilor Gram negative. Din punct de vedere chimic, sunt glicoproteine sau lipoproteine.

O categorie specială de bacteriocine, o constituie cele sintetizate de *Pseudomonas aeruginosa* (bacilul piocianic), denumite *piocine*. Ele se evidenţiază în lizatele culturilor, după inducţia sintezei cu UV, sub forma unor bastonaşe perechi, asemănătoare cozilor contractile ale

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

fagilor din seria T-par, infecţioşi pentru *E. coli*, cu lungimea de 90-125 nm şi grosimea de 20 nm. Uneori, perechile de bastonaşe apar contractate, mai scurte şi groase, iar între cele două structuri electrono-dense se evidenţiază zona centrală ("core"), echivalentul structural al cilindrului axial al cozii fagului.

Mecanismele de acţiune a bacteriocinelor

Bacteriocinele produse de celulele Gram negative acţionează prin mecanisme specifice asupra unor "ţinte" situate în membrană sau în citoplasmă. Spectrul foarte limitat de acţiune a bacteriocinelor produse de celulele Gram negative, sugerează existenţa unor receptori prin care acestea îşi dobândesc accesul la structurile sensibile. De fapt, moleculele care funcţionează ca receptori nu sunt specializate în acest sens, ci îndeplinesc diferite activităţi, în special de transport celular al unor substanţe nutritive.

Mecanismele de acţiune s-au studiat pentru colicine (produse de *E. coli*). După fixarea ireversibilă la nivelul receptorilor membranei externe, colicinele îşi exercită efectul bactericid prin unul din următoarele mecanisme:

- inhibarea fosforilării oxidative, stopând astfel procesele energetice celulare. Consecutiv se produce alterarea permeabilităţii membranei plasmatice, blocarea sintezei macromoleculare (ADN, ARN, proteine), ca şi a transportului activ al substanţelor nutritive;
- unele colicine se fixează specific pe molecula de ADN şi determină apariţia inciziilor monocatenare, ceea ce deschide calea acţiunii nucleazelor celulare şi a degradării ADN;
- altele inactivează subunităţile ribosomale 30 S, prin clivarea ARNr 16 S.

In concluzie, bacteriocinele au efect bactericid asupra celulelor sensibile. Ceea ce le deosebeşte fundamental de alte antibiotice este faptul ca au efect letal asupra celulelor în care s-au sintetizat şi din această cauză, proprietatea de bacteriocinogeneză nu se poate perpetua într-o celulă, decât în starea ei potenţială. Periodic, sinteza bacteriocinelor este indusă şi celula producătoare se lizează, eliberând moleculele cu efect litic în mediu. Efectul litic al bacteriocinelor se manifestă numai asupra celulelor aceleiaşi specii, care nu o pot codifica, fiind lipsite de factorul *Col.* Celulele care poartă factorul *Col* sunt rezistente la acţiunea colicinei omologe, elaborată de celule purtătoare ale aceluiaşi factor, ca şi cum ar fi imune la acţiunea lor.

Originea plasmidelor este un subiect de speculaţii. Plasmidele par să fi evoluat din EGT, a căror structură genetică s-a complicat progresiv, prin dobândirea de gene noi. Plasmidele au specificitate de gazdă. Fiecare grup de bacterii pare să aibă setul propriu de plasmide. In general, plasmidele rezidente în bacteriile Gram pozitive nu se stabilizează în celulele Gram negative şi invers. Fac excepţie plasmidele enterobacteriilor, care pot fi transferate la multe, dacă nu la toate genurile de bacterii.

MECANISMELE VARIABILITĂŢII LA BACTERII

Bacteriile trăiesc cel mai adesea în medii nefavorabile, în care o serie de factori nocivi, fizici sau chimici produc alterări ale materialui genetic.

Variabilitatea genetică a bacteriilor este rezultatul acţiunii mecanismelor de *mutageneză*, a *mobilitaţii unor secvenţe genomice* speciale şi a *mecanismelor de transfer de material genetic.*

1. Mutaţiile

Molecula de ADN este o ţintă cu situsuri multiple pentru acţiunea factorilor lezionali endogeni şi exogeni. Nucleotidele din incizura majoră a dublului helix, sunt mai sensibile la modificare decât cele din incizura minoră. Unii dintre atomii bazelor purinice şi pirimidinice sunt mai sensibili decât alţii. Din aceste considerente, molecula de ADN este o ţintă heterogenă pentru acţiunea agenţilor lezionali.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

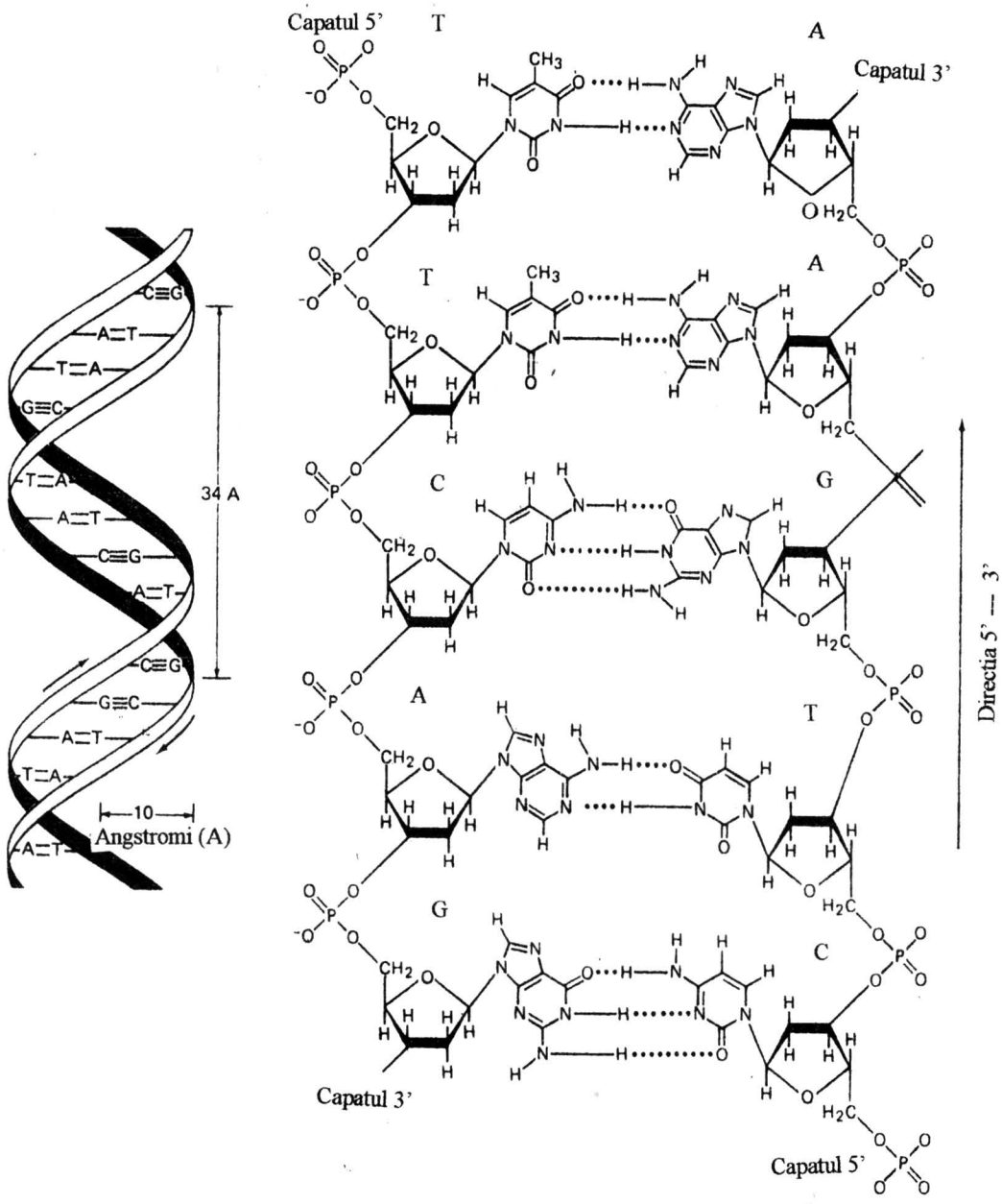


Fig. 204. Modelul structural al moleculei de ADN care evidenţiază configuraţia dublu helicală şi raporturile celor două catene nucleotidice. În stânga, reprezentarea diagramatică a moleculei. Catenele asemănătoare unor panglici reprezintă axul central al moleculei de ADN. Cele două catene sunt antiparalele. Este ilustrată împerecherea bazelor, legăturile de H şi dimensiunile moleculei de ADN. Un tur de helix cuprinde lo perechi de baze. În dreapta, o scurtă seveţă a moleculei de ADN care arată raportul dezoxiribozei şi acidului fosforic cu bazele.

Mutaţiile sunt produse prin modificări stabile ale secvenţei de baze ale unei gene, transmisibile la descendenţi. Ele pot fi punctiforme, adică implică modificarea unei singure baze sau se datorează modificării unui număr mai mare de perechi de baze. Mutaţiile modifică totdeauna genotipul, dar în funcţie de natura lor pot să nu fie exprimate în fenotip.

In funcţie de agentul cauzal, mutaţiile sunt induse de factori *endogeni* (denumite şi mutaţii *spontane*) şi de factori *exogeni* (denumite şi mutaţii *induse*).

Expresia fenotipică a unei mutaţii este precedată totdeauna, de apariţia unor modificări lezionale ale moleculei de ADN, care scapă acţiunii corective a mecanismelor reparatorii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mutaţiile spontane se produc în absenţa acţiunii oricărui agent, cunoscut ca având efecte asupra moleculei de ADN. Diferite activităţi metabolice, în special anaerobe, pot să genereze intermediari cu efecte lezionale faţă de ADN. Cei mai cunoscuţi sunt intermediarii reducerii O_2 (H_2O_2, radicalul superoxid, radicalul OH). Generarea intermediarilor care lezează ADN, în metabolismul anaerob, este argumentată de inducerea enzimelor de reparare a ADN în condiţii de anaerobioză.

Mutaţiile spontane sunt punctiforme. Ele apar în timpul replicării ADN şi par a fi datorate erorilor de împerechere a bazelor între catena nou sintetizată şi cea veche.

Mutaţiile spontane *punctiforme* rezultă prin substituţia unei perechi de baze şi se datorează unor fenomene de *transversie*.

Transversiile sunt substituţii de perechi de baze, în care, axa purină-pirimidină este schimbată de la GC la CC sau la TA. Acestea sunt modificări rare şi apar ca o consecinţă a împerecherilor greşite ce au loc în timpul replicării ADN. Transversiile sunt rezultatul fenomenelor de *tautomerie*. Toate cele 4 baze pot coexista în diferite forme tautomere ce se deosebesc prin schimbarea poziţiei unui proton: grupul –C=O (cetonic) este transformat în grupul –C=OH (enol), iar gruparea $–NH_2$ este transformată în gruparea –NH (imina). In condiţii normale, predomină grupările cetonică şi aminică.

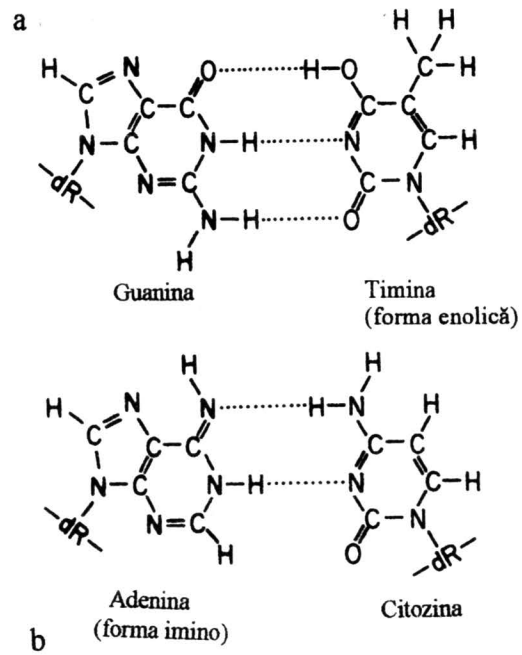


Fig. 205. Schimbări în împerecherea bazelor, datorate stărilor tautomerice. În forma enolică (a), timina formează legături de H cu guanina, în locul adeninei. În forma imino (b), adenina formează legături de H cu citozina, în locul timinei. Modificări similare ale guaninei şi citozinei determină modificări ale împerecherii bazelor.

Apariţia grupărilor tautomere (enol şi imino), produce o relaxare a împerecherii bazelor şi permit guaninei să formeze pereche cu timina (în loc de citozină), păstrând perechea purină-pirimidină. Dacă perechea GT nu este corectată la replicare, unul din cromosomi va avea perechea normală AT (în loc de GC) şi astfel s-a produs o mutaţie punctiformă.

Depurinarea este consecinţa sensibilităţii înalte la hidroliză, a legăturilor glicozilice care leagă guanina în catena nucleotidică, dar celelalte, care leagă adenina sau bazele pirimidinice (citozina, timina) sunt mai stabile. Situsurile apurinice astfel rezultate (şi mai rar apirimidinice) sunt recunoscute de sistemele de supraveghere şi reparare.

In cursul replicării ADN, uneori, nucleotidele sunt încorporate greşit. Perechile incorecte pot scăpa funcţiei de control ("editing") a ADN-polimerazei.

Disponibilitatea limitată a dUTP sau inhibiţia sistemului enzimatic a timidilat-sintetazei, are ca rezultat inhibiţia sintezei dTTP şi încorporarea uracilului în locul timinei. Prezenţa uracilului este recunoscută de sistemele de reparare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Oxigenul singlet, radicalul superoxid, radicalul OH (OH·) liber produc leziuni la nivelul restului glucidic, a căror consecinţă poate fi ruperea catenei ADN.

Mutaţiile induse sunt rezultatul leziunilor produse de acţiunea factorilor *exogeni* asupra moleculei de ADN şi apar cu o rată net superioară faţă de nivelul ratei mutaţiilor spontane.

Factorii mutageni exogeni sunt *agenţii chimici* şi *radiaţiile*.

Agenţii chimici cu efect mutagen acţionează la nivel molecular prin alterarea secvenţei de baze a ADN: *analogi ai bazelor*, *agenţi alchilanti*, *agenţi de dezaminare*, *derivaţi ai acridinei*.

Un analog al unei baze este o moleculă similară ca structură, cu una din bazele azotate ale ADN. O celulă poate încorpora în ADN, un analog al bazei, în locul bazei normale. De exemplu, 5-bromo-uracilul (5-BU) poate fi încorporat în locul timinei.

Analogii bazelor induc substituţia unei baze prin fenomenul de *tranziţie*. Tranziţia rezultă prin înlocuirea unei purine cu o altă purină, sau a unei pirimidine cu altă pirimidină, adică o schimbare de la perechea GC la AT sau invers.

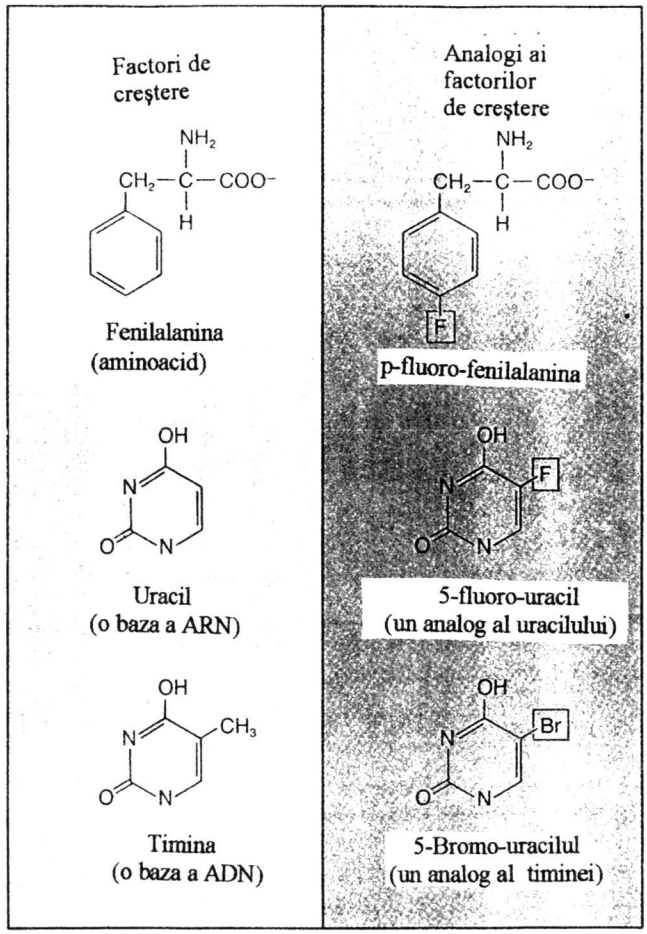


Fig. 206. Exemple de analogi ai factorilor de creştere.

5-BU şi analogii săi tautomerizează mai uşor decât bazele naturale. In forma –C=O, 5-BU se împerechează cu A şi este încorporat în ADN, formând o pereche pseudo-AT. În forma –C=OH, la următorul rund de replicare, 5-BU se împerechează cu G, în locul lui A. La un nou rund de replicare, tranziţia de la AT la GC se va stabiliza.

Agenţii alchilanţi sunt substanţe care adaugă gruparea alchil (ca de exemplu, $-CH_3$), la alte molecule. Adăugând un grup alchil la o bază azotată, îi modifică dimensiunile şi determină o eroare de împerechere. Agenţii alchilanţi acţionează asupra ciclurilor purinice azotate, la nivelul O^6 al guaninei sau O^4 din bazele pirimidinice, producând leziuni mutagene, dar şi la nivelul legăturilor fosfodiesterice ale catenei de ADN.

Agenţii alchilanţi se formează prin prepararea multor produse alimentare, în gazele de eşapament prin combustia internă a N_2 atmosferic, formându-se nitraţi şi nitriţi. Prin arderea tutunului, a produselor petroliere şi prin prepararea alimentelor, din resturile de guanină se formează hidrocarburi policiclice aromatice, cu efect alchilant asupra ADN.

Agenţii de dezaminare (de exemplu, acidul nitros) scot un grup $-NH_2$ dintr-o bază azotată. Conversia adeninei la hipoxantină, a guaninei la xantină şi a citozinei la uracil, prin dezaminare, are efecte mutagene pentru că bazele dezaminate se împerechează cu alte baze decât cu cele normale. De exemplu, dezaminarea citozinei la uracil modifică perechea C=G la perechea U=A, iar dezaminarea adeninei la hipoxantină (analogă guaninei), modifică perechea A=T la G=C.

NO_3^- şi NO_2^- se adaugă la unele alimente (preparate din carne) pentru culoare, miros sau pentru acţiune antibacteriană. In tubul digestiv se formează *nitrozamine*. Acestea sunt *agenţi de dezaminare* care produc cancere ale tractului digestiv şi efecte defavorabile asupra dezvoltării fătului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

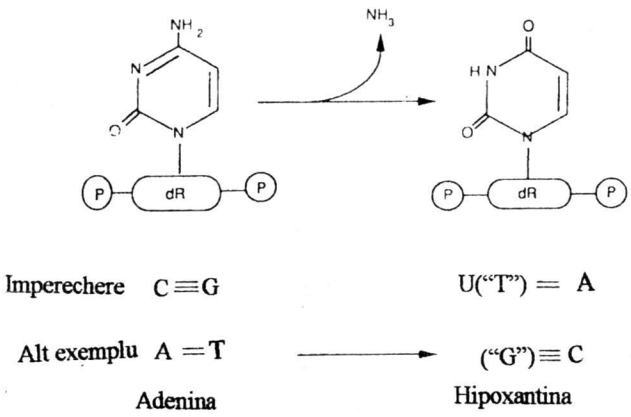


Fig. 207. Reacţiile de dezaminare au consecinte mutagene, pentru că bazele dezaminate se împerechează greşit.

In contrast cu aceste alterări care produc mutaţii punctiforme, derivaţii *acridinei,* cauzează mutaţii prin *schimbarea cadrului de citire.* Molecula de acridină conţine un inel pirimidinic şi două inele benzenice. Molecula sau unul din derivaţii săi se inseră în dublul helix al ADN, înlocuind ambele baze ale unei perechi. Modificarea deformează helixul şi produce despiralizarea parţială a catenelor de ADN. Despiralizarea permite ca una sau mai multe baze să fie adăugate sau eliminate. Rezultă astfel, o mutaţie prin schimbarea cadrului de citire.

Mutaţiile prin schimbarea cadrului de citire, constau în inserţia sau deleţia uneia sau câtorva baze în molecula de ADN (un număr diferit de multiplu de 3). Ele determină schimbarea cadrului de citire, pentru că dincolo de situsul mutaţiei, toţi codonii îşi schimbă secvenţa de baze. A II-a schimbare a cadrului de citire, de aceiaşi mărime, dar în sens invers, restabileşte cadrul iniţial de citire a informaţiei genetice. O astfel de mutaţie se numeşte *supresoare* a primei mutaţii şi pentru că are loc în aceiaşi genă, fenomenul se numeşte *supresie intragenică.*

Coloranţii de acridină, în special proflavina, induc mutaţii ale cadrului de citire. Proflavina este o molecula planară, cu dimensiuni similare cu ale unei perechi purină-pirimidină şi se intercalează între bazele ADN. Mutagenii care schimbă cadrul de citire sunt *agenţi de intercalare*, dar nu toţi agenţii de intercalare schimbă cadrul de citire.

Mutaţiile punctiforme ale ADN (tranziţii, transversii sau cele produse prin schimbarea cadrului de citire) modifică secvenţa de baze în ARNm. O mutaţie de sens greşit dă naştere unui codon ce specifică un alt aminoacid decât cel codificat original. Efectul aminoacidului nou asupra polipeptidului, depinde de poziţia aminoacidului şi de natura schimbării. Polipeptidul poate să rămână nemodificat, dar alteori funcţia sa se poate pierde complet sau mutaţia poate genera o proteină cu stabilitate termică alterată. La o temperatură relativ scăzută (permisivă), proteina funcţionează normal, iar la temperaturi mai mari (nepermisive), proteina este nefuncţională (mutantă termosensibilă). Dacă rezultatul este moartea celulei, mutaţia se numeşte *condiţionat letală*, adică este letală numai la temperatură nepermisivă.

Mutaţiile punctiforme pot schimba un codon sens (care specifică un aminoacid), la un codon care specifică terminarea sintezei proteinei (UAG, UAA, UGA). Se sintetizează o proteină incompletă, în locul celei normale. Astfel de codoni mutanţi se numesc *nonsens*, deoarece nu codifică încorporarea unui aminoacid.

Generarea unui codon nonsens într-o genă proximală a unui operon, poate induce

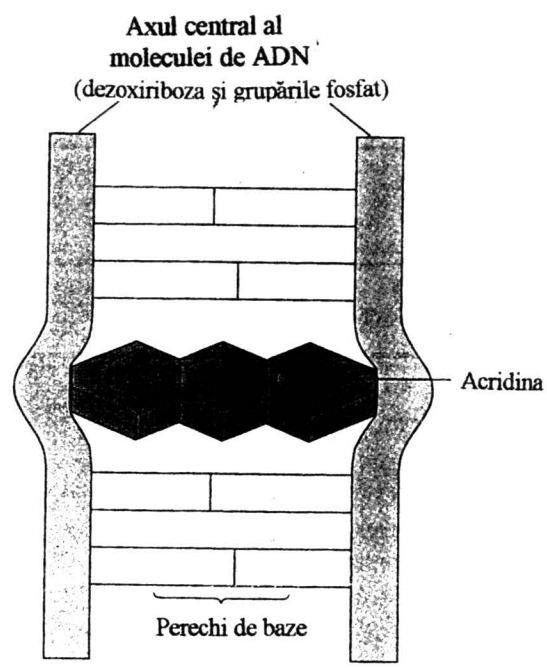


Fig. 208. Inserţia acridinei în dublul helix ADN poate produce o mutaţie prin schimbarea cadrului de citire.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

un *efect polar* asupra celorlalte gene ale operonului, situate distal faţă de situsul codonului nonsens.

Codonul nonsens semnifică stoparea traducerii ARNm şi peptidul nascent este eliberat din ribosomi. Uneori, ribosomii se pot reataşa la ARNm, distal faţă de situsul nonsens, la un alt situs de legare. Dacă numărul ribosomilor care se reasociază cu ARNm, este mai mic decât normal, rezultă fenomenul de *polaritate a traducerii.* Uneori, efectul polar asupra traducerii este puternic, adică genele situate distal faţă de situsul mutaţiei nonsens sunt foarte puţin exprimate.

Mutaţiile punctiforme sunt dependente de replicarea ADN, pentru consolidare.

Mutaţiile majore produse prin modificarea unui număr mare de baze se datorează *deleţiilor, duplicaţiilor, inversiilor şi adiţiilor.* Mutaţiile majore pot să implice secvenţe de ADN ce depăşesc mărimea unei gene, iar efectele lor sunt mult mai ample decât ale mutaţiilor punctiforme. Ele se datorează erorilor de replicare, evnimentelor de recombinare între secvenţele omologe de ADN sau acţiunii mecanismelor de reparare. Deleţiile sunt rezultatul acţiunii mecanismelor de transpoziţie a elementelor genetice transpozabile (EGT).

Erorile de replicare a ADN (erori de copiere) se datorează alunecării unei catene a ADN în raport cu cealaltă, în timpul replicării. După ce s-au separat tranzitoriu, cele două catene se realiniază incorect, datorită formării unei bucle pe catena matriţă. Reluarea copierii la o secvenţă ce precede bucla produce o *duplicaţie,* iar reluarea copierii în aval de buclă, determină o deleţie în catena nou sintetizată.

Deleţiile şi inversiile pot fi rezultatul recombinării intra- şi inter-repliconi, pentru că recombinarea necesită duplicaţii de secvenţe. Recombinarea între secvenţe omologe, cu aceiaşi orientare într-o moleculă de ADN, duce la pierderea unei copii a secvenţei duplicate.

Radiaţiile UV sunt mutagene. ADN absoarbe radiaţiile cu lungimea de undă de circa 260 nm. Majoritatea celulelor bacteriene mor, dar cele care supravieţuiesc suferă mutaţii cu o frecvenţă înaltă. Cea mai frecventă leziune indusă de radiaţiile UV, este formarea *dimerilor pirimidinici.* Intre pirimidinele adiacente, pe aceiaşi catenă se formează legături covalente, astfel încât ele sunt reunite printr-un *inel ciclobutan.* Se formează în special dimeri T-T, dar şi C-C sau T-C. Formarea dimerilor deformează molecula de ADN şi interferă cu împerecherea normală a bazelor. Replicarea ADN se întrerupe la dimerii T-T şi este reluată distal, la oarecare distanţă. Astfel, în catena nou sintetizată, apare o discontinuitate, care, dacă nu este reparată, devine letală.

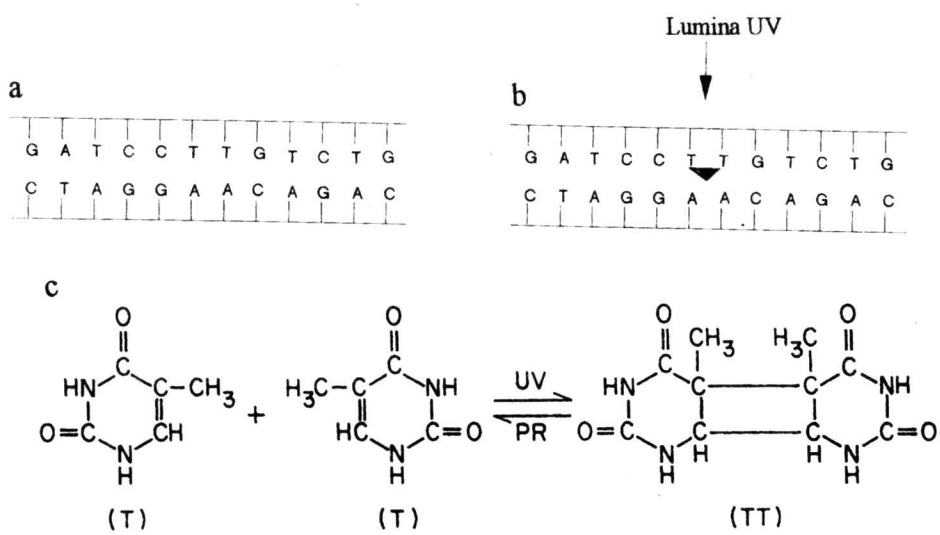


Fig. 209. Modificări induse de radiaţiile UV în molecula de ADN. a. Secvenţa bazelor în molecula de ADN. b, c. Sub acţiunea luminii UV se formează dimeri de timină (după Russell, 1998).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Radiaţiile ionizante (gama şi X) au energie înaltă şi acţionează prin ruperea legăturilor chimice ale moleculelor. Se formează radicali liberi, atomi foarte reactivi, molecule sau ioni ce atacă alte molecule ale celulei, inclusiv molecula de ADN. Efectul radiaţiilor ionizante constă în primul rând, în radioliza apei prin care se generează radicali OH (OH·). Radicalul OH· este capabil să mobilizeze protoni de la C'_4 al dezoxiribozei sau de la bazele pirimidinice. Se labilizează legăturile fosfodiesterice cu posibila apariţie a ruperilor mono- sau dublu catenare.

Reparaţia genetică

Supravieţuirea bacteriilor în mediile ostile se datorează parţial, sistemelor de supraveghere ce recunosc leziunile apărute în structura ADN şi activează o cascadă de evenimente moleculare ce restabilesc integritatea structurală şi funcţională a moleculei originale.

ADN este singura macromoleculă ale cărei leziuni sau defecte pot fi corectate prin acţiunea unor sisteme enzimatice.

Mecanisme de reparaţie genetică

Reparaţia genetică se face prin mai multe mecanisme:

a) *Reversia directă* a leziunii, fără sinteza unor noi legături fosfodiesterice. In această categorie intră *fotoreactivarea şi răspunsul reparator adaptativ*;

b) *Mecanismul reparator prin excizie şi resinteză*, bazat pe incizia catenei lezate la sau lângă situsul leziunii, excizia şi resinteza secvenţei excizate, folosind ca matriţă, catena complementară normală;

c) Reparaţia prin *recombinare după replicare* implică schimbul de catene prin recombinare;

d) Reparaţia prin *sistemul inductibil "SOS"* a leziunilor ce nu pot fi corectate prin sistemele constitutive.

Fotoreactivarea

Dată fiind frecvenţa mare a mutaţiilor induse de radiaţiile UV, celulele bacteriene şi-au elaborat mecanisme cu acţiune promptă pentru eliminarea leziunilor specifice şi restabilirea secvenţei normale. Dacă celulele tratate cu radiaţii UV sunt expuse acţiunii luminii vizibile cu lungimea de undă de 300-400 nm, atât frecvenţa mutaţiilor, cât şi letalitatea, scad foarte mult. Fenomenul se numeşte *fotoreactivare*. Iradierea UV produce o leziune caracteristică în molecula de ADN: o legătură chimică stabilă, respectiv a unui dimer de tipul *ciclobutil*, cu patru atomi de carbon între două baze pirimidinice adiacente.

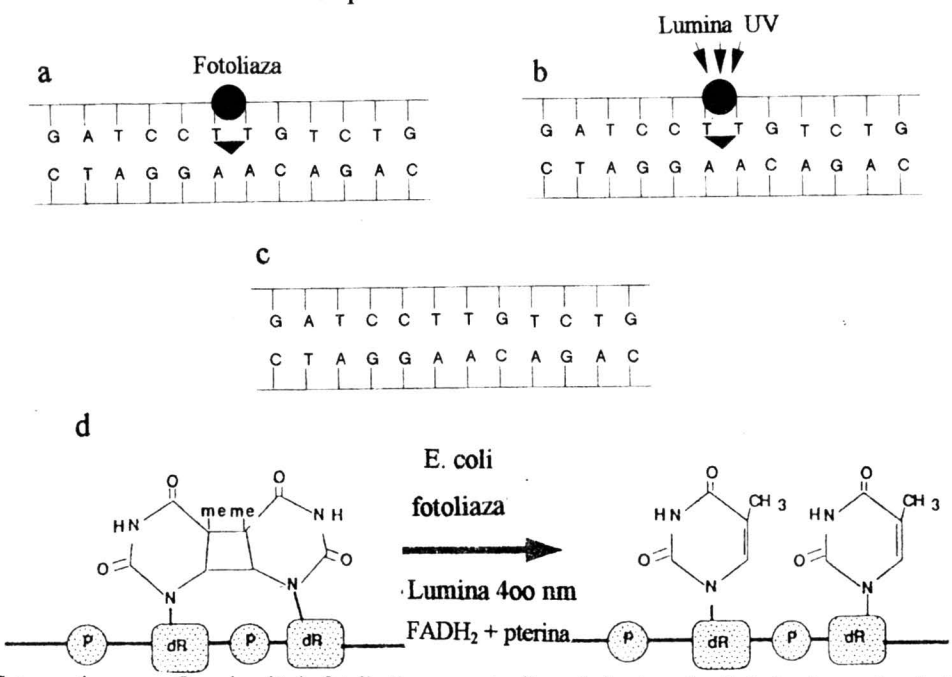


Fig. 210. Fotoreactivarea. a. O moleculă de fotoliază recunoaşte dimerul şi este activată de lumina cu lungimi de undă specifice. b. Dimerul este clivat. c. Secvenţa ADN este restabilită. d. Reacţia de fotoreactivare enzimatică a dimerilor pirimidinici de ciclobutan.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dimerii pirimidinici se formează cel mai adesea (50%) între două resturi de T, ceva mai rar între un rest de T şi unul de C (40%) şi foarte rar între două resturi de C (10%). Lumina vizibilă activează o *fotoliază*, enzimă ce hidrolizează inelul de ciclobutan şi reveresează reacţia produsă de radiaţia UV, fără erori, restabilind bazele monomere. Fotoreversia implică transferul de energie de la molecula de pterină, la $FADH_2$ şi transferul electronilor la dimerul pirimidinic.

Spre deosebire de mecanismul de reparare indus de lumina vizibilă, care repară leziunile fără erori, celula bacteriană posedă mecanisme de reparare la întuneric, dar predispuse la erori, adică generatoare de mutaţii, cu frecvenţă mare.

Răspunsul reparator adaptativ

Acest tip de răspuns se activează după expunerea prelungită a celulelor de *E. coli,* la concentraţii mici de substanţe mutagene, ca de exemplu, N-metil-N'-nitro-nitrozoguanidina (MNNG) sau etil-metan-sulfonatul. Celulele bacteriene tratate cu concentraţii mici de agenţi alchilanţi, care preced administrarea dozelor letale sau mutagene, devin rezistente la acţiunea mutagenă sau letală a unor concentraţii de câteva sute de ori mai mari de substanţă activă.

Răspunsul fiziologic al celulelor de *E. coli,* la acţiunea agenţilor metilanţi sau etilanţi s-a numit *răspuns adaptativ.*

Agenţii metilanţi sau etilanţi produc leziuni ale moleculei de ADN, printr-un proces de alchilare, adică grefarea unei grupări alchil (metil, etil) pe un atom de C, N sau O.

Efectul MNNG constă în adaugarea unei grupări metil ($-CH_3$), legată de un atom de O, în pozitia C^6 a guaninei. Formarea leziunii O^6-alchil-guanină, este însoţită de pierderea legăturilor de H care leagă G metilată de C de pe catena opusă.

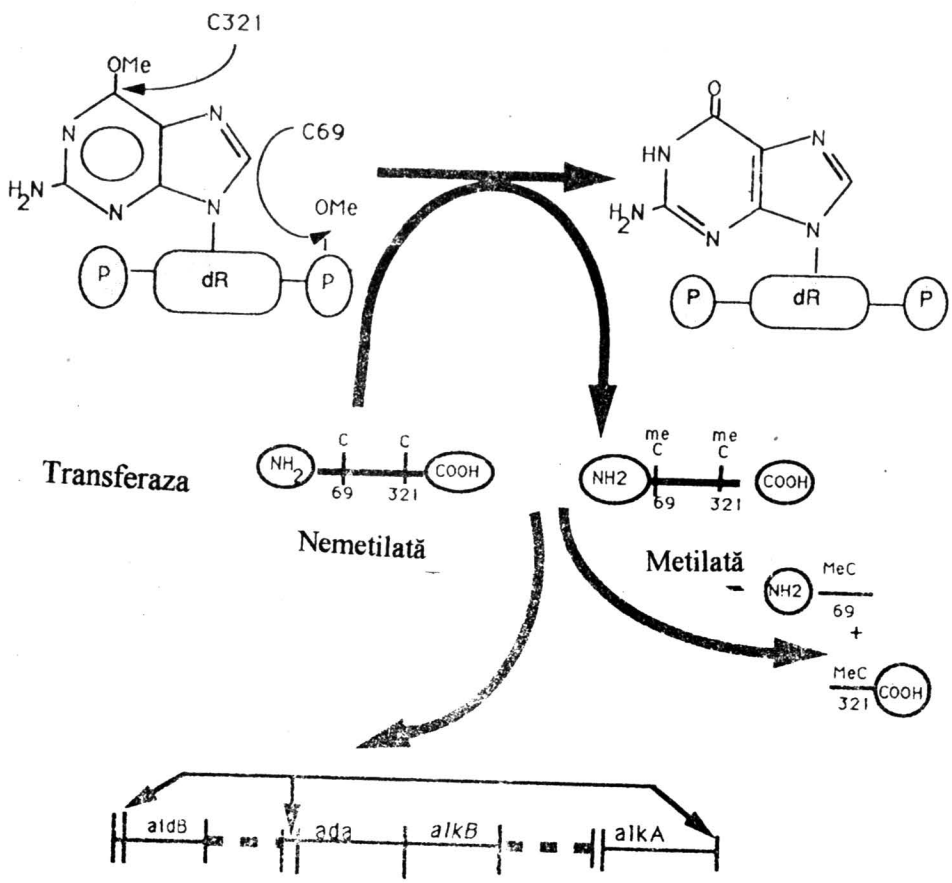


Fig. 211. Reversia leziunilor produse de agenţii alchilanţi la nivelul grupărilor fosfat şi la nivelul guaninei. Grupările alchil sunt transferate la resturile de cisteină ale transferazei, a cărei sinteză este indusă de agenţii alchilanţi. După metilare, enzima se inactivează (după Grossman, 1992).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Procesul reparator este dependent de sinteza proteică *de novo*. Se sintetizează o *metil-transferază* – proteina *Ada*, care îndepărtează specific grupul metil de la legătura fosfodiesterică şi grupul metil din O^6-metil-guanină. Grupările metil nu sunt eliberate în stare liberă, ci sunt transferate direct, de la ADN alchilat, la proteină. Din reacţie rezultă proteina *Ada* metilată şi guanina nemodificată. Prin metilare, transferaza se inactivează. Sinteza transferazei este indusă pentru că mono- sau dimetil-transferaza activează transcrierea operonului codificator *ada*, care pe lângă gena *ada* cuprinde genele *alk B* (cu rol necunoscut) şi *alk A*, pentru sinteza ADN-glicozilazei. ADN-glicozilaza acţionează asupra 3-metil-adeninei, 3-metil-guaninei, O^2-metil-citozinei şi O^2-metil-timinei. Proteina *Ada* metilată se leagă de operatorul genei *ada* şi acţionează ca reglator pozitiv. Reglarea negativă este controlată de protează care clivează metil-transferaza (*Ada*), la cisteina 69 şi 321.

Repararea prin excizia bazelor, catalizată de glicozilaze şi endonucleaze

Bazele modificate prin dezaminare pot fi excizate de un grup de enzime denumite *ADN-glicozilaze*, care hidrolizează specific legătura N-glicozil a bazei cu deoxiriboza catenei. Rezultă astfel, un situs apirimidinic sau apurinic (AP).

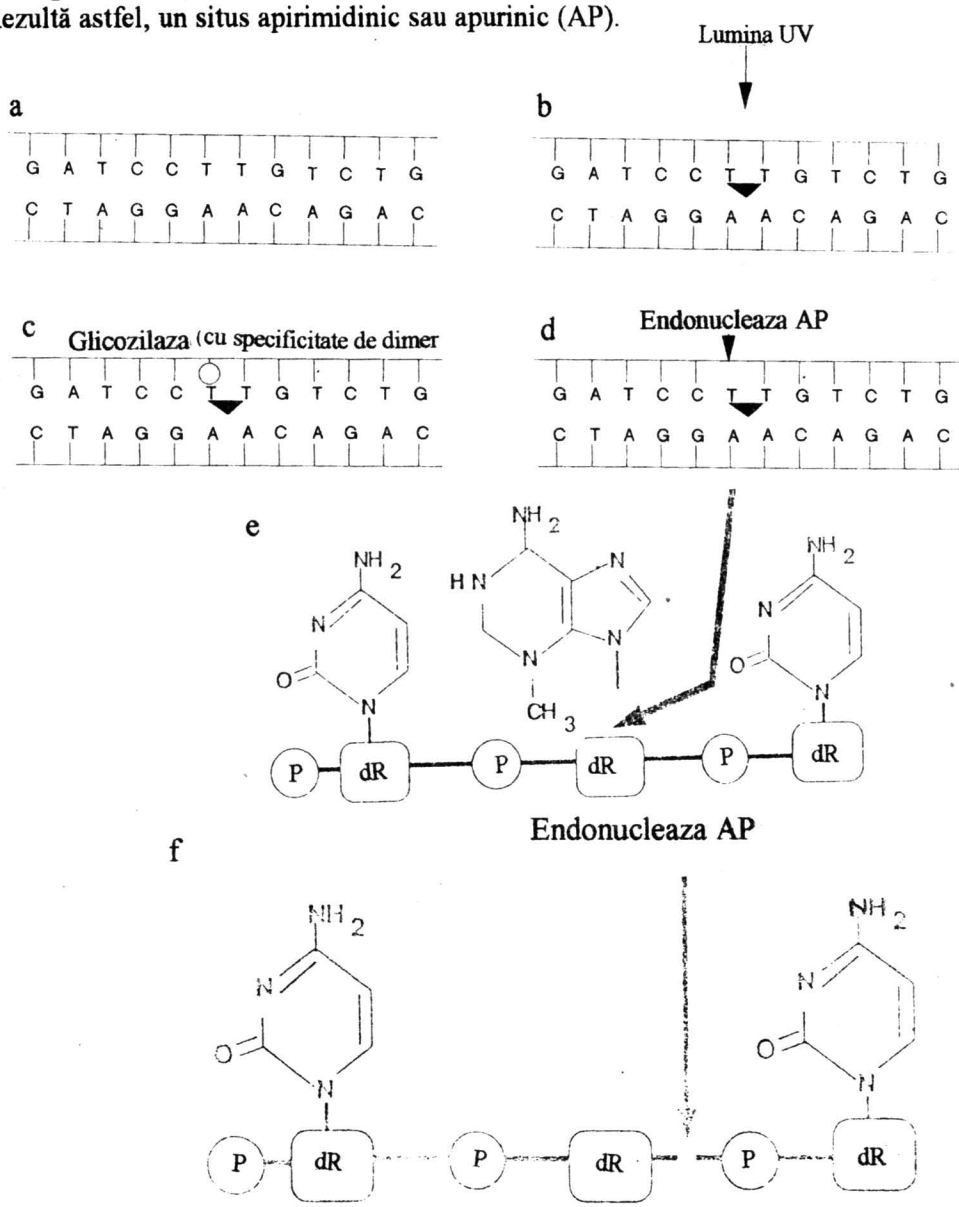


Fig. 212. Repararea prin excizia bazelor, catalizată de glicozilaze şi endonucleaze. Dimerul format după exunerea bacteriilor la UV (a, b) este îndepărtat sub acţiunea glicozilazei şi endonucleazei AP (*AP*urinic sau *AP*irimidinic) specifice. Glicozilaza specifică, indusă de agentul lezional recunoaşte dimerul pirimidinic şi clivează legătura glicozidică dintre bazele lezate şi dezoxiriboză, rezultând un situs apirimidinic sau apurinic. Endonucleaza recunoaşte situsurile AP şi hidrolizează legăturile fosfodiesterice ale dezoxiribozei (c, d, e, f)(după Grossman, 1992).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ADN-glicozilazele sunt enzime mici, cu specificitate înaltă, foarte bine conservată în evoluţie, atât ca structură, cât şi ca mecanism de acţiune, de la bacterii până la om.

Situsurile AP din catenă de ADN sunt recunoscute de o fosfodiesterază specifică, cu acţiune endonucleazică şi sunt clivate în poziţia 5', 3' sau în ambele poziţii, generând o breşă în molecula de ADN.

Reparaţia prin excizia şi resinteza nucleotidelor

Mecanismul de reparaţie prin excizie şi resinteză, constă în excizia enzimatică a secvenţei lezate, urmată de completarea sa prin resinteză, utilizând ca matriţă, catena complementară rămasă intactă. Spre deosebire de procesul fotoreactivării, în cursul căruia dimerii de T sunt clivaţi *în situ* şi rezultă monomerii corespunzători, în reparaţia la întuneric, dimerii sunt îndepărtaţi din molecula de ADN, prin excizia fragmentului în care s-au format.

Reparaţia prin excizie şi resinteză, a fost caracterizată la *E. coli* şi este mediată de cel puţin 6 produse genice ale sistemului *uvr*:

- proteina *UvrA,* sub formă dimerică, se leagă de ADN în prezenţa ATP;
- ulterior, se asociază proteina *UvrB*. Complexul Uvr_2AB este translocat de la situsul iniţial al ADN, la situsul lezat, de o ATP-ază asociată cu *UvrB*, care este activată prin formarea complexului $UvrA_2B$-ADN;
- proteina *UvrC* face două clivări în catena de ADN, la 7 nucleotide în direcţia 5' faţă de situsul lezat şi la 3-4 nucleotide în direcţia 3' faţă de acelaşi situs;
- în prezenţa proteinei *UvrD* (cu rol de helicază), a ADN-polimerazei I şi a substratului (deoxiribonucleozid-trifosfaţi), fragmentul lezat este eliberat, iar proteinele *UvrA, UvrB, UvrC* sunt recirculate.

Continuitatea catenei clivate se restabileşte prin sinteza *de novo,* catalizată de ADN-polimeraza I, utilizând ca matriţă, catena intactă, iar polinucleotid-ligaza restabileşte continuitatea secvenţei.

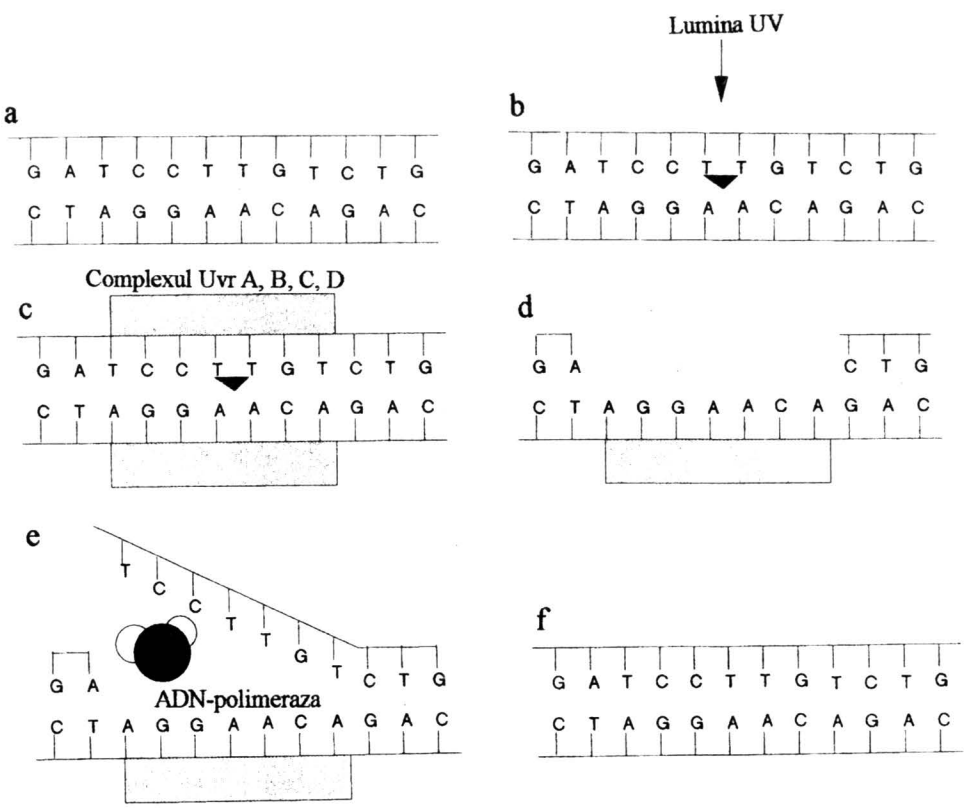


Fig. 213. Repararea nucleotidelor prin excizie şi resinteză. Dimerii pirimidinici care se formează sub acţiunea radiaţiei UV sunt recunoscuţi de complexul enzimatic UvrA, UvrB şi Uvr C (c). În prezenţa Uvr D, complexul clivează catena de ADN (d), iar ADN-polimeraza resintetizează catena lezată, folosind ca matriţă, catena opusă (e, f).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reparaţia prin recombinare post-replicativă

Reparaţia prin recombinare a fost descrisă la tulpinile de *E. coli*, incapabile să desfăşoare reparaţia prin excizia dimerilor pirimidinici. Replicarea moleculei de ADN cromosomal, purtătoare de dimeri T, este însoţită de producerea breşelor în catenele complementare nou sintetizate, în poziţii opuse dimerilor. Breşele sunt completate într-o etapă ulterioară replicării. De aici a derivat denumirea de *reparaţie postreplicativă.* Reparaţia prin recombinare postreplicativă s-a studiat pe molecule de ADN purtătoare de dimeri pirimidinici, dar este activă şi faţă de leziunile produse de alţi agenţi .

Prezenţa leziunilor dimerice care nu au fost îndepărtate prin mecanismele fotoreactivării sau al exciziei, are tendinţa de a bloca înaintarea complexului de replicare. In cursul reparării prin recombinare postreplicativă, ADN-polimeraza "sare" sau ocoleşte leziunea dimerică, pentru a reiniţia sinteza ADN la oarecare distanţă (100-1000 de baze) de dimer, în regiunea normală a catenei matriţă. Astfel, în catena nou sintetizată, se produce o breşă (gap), situată într-o regiune opusă leziunii. Breşa este ulterior completată printr-un schimb de material genetic, într-un proces de recombinare între catena incompletă şi catena intactă.

Sistemul reparator inductibil "SOS"

Lezarea severă a ADN, care interferă cu capacitatea sa de replicare, determină activarea genelor care fac parte din reţeaua de reglare "SOS".

Activitatea reparatorie "SOS" este dependentă de produsele de sinteză a genelor *rec* A^+ şi *lex* A^+. Cele două gene codifică nu numai proteine reglatoare ale reparaţiei ADN, ci au şi alte funcţii:

- inducţia litică a unor fagi infecţioşi pentru *E. coli*;
- întârzierea diviziunii celulare, care duce uneori la formarea filamentelor etc.

Proteina *Rec A* are un rol esenţial în reparaţia "SOS". Ea îndeplineşte două funcţii:

- funcţia de protează în activitatea reglatoare a sistemului;
- funcţia de enzimă de recombinare în reparaţia postreplicativă.

Mutantele *rec* A^- sunt defective pentru capacitatea de recombinare genetică în general şi pentru exprimarea sistemului inductibil "SOS" şi, din această cauză, sunt foarte sensibile la acţiunea radiaţiilor UV.

Substratul activităţii proteolitice a proteinei *Rec A* este represorul fagului λ. Consecinţa este evoluţia lizogenă a cuplului *E. coli*-fag λ şi inducţia proteinei *Lex A* în cursul reparaţiei "SOS".

Lezarea ADN intensifică sinteza proteinei *Rec A*. Ea trebuie să dobândească activitate proteolitică, pentru a cliva proteina *Lex A* şi represorul λ.

Funcţia de enzimă de recombinare a proteinei *Rec A,* constă în stimularea formării perechilor omologe între două molecule de ADN, adică de a alinia precis fragmentele de ADN care au secvenţe de baze complementare, pentru schimbul reciproc de baze prin recombinare.

Proteina Lex A (circa 24 kD) are funcţia de represie prin legarea de operatorul a circa 14 gene: *rec A, uvr A, uvr B, uvr B, uvr D* etc., precum şi a propriei sale gene *lex A*. Astfel, proteina *Lex A* permite transcrierea ARNm şi sinteza proteinelor codificate de aceste gene, la nivele foarte scăzute în celulele neinduse. In celulele neinduse (normale), funcţia "SOS" este represată.

Când celulele sunt expuse acţiunii unor factori care produc leziuni importante ale ADN, ce nu pot fi reparate de nivelul scăzut al enzimelor de reparaţie prezente constitutiv, în molecula de ADN dublu catenară apar zone de discontinuitate (breşe) monocatenare, postreplicative. Moleculele de *rec A* prezente constitutiv în celulă, se leagă de ADN monocatenar rămas intact în regiunea opusă breşelor. Se produce un semnal inductor care activează funcţia de protează a proteinei *rec A* şi odată cu aceasta, răspunsul "SOS". Proteina *Rec A* activată, clivează represorul *Lex A* în două subunităţi inactive şi genele controlate de acest represor – *uvr A, uvr B, uvr C uvr D* şi *lex A* sunt deblocate şi sunt transcrise cu o rată crescută, pentru sinteza proteinelor corespunzătoare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

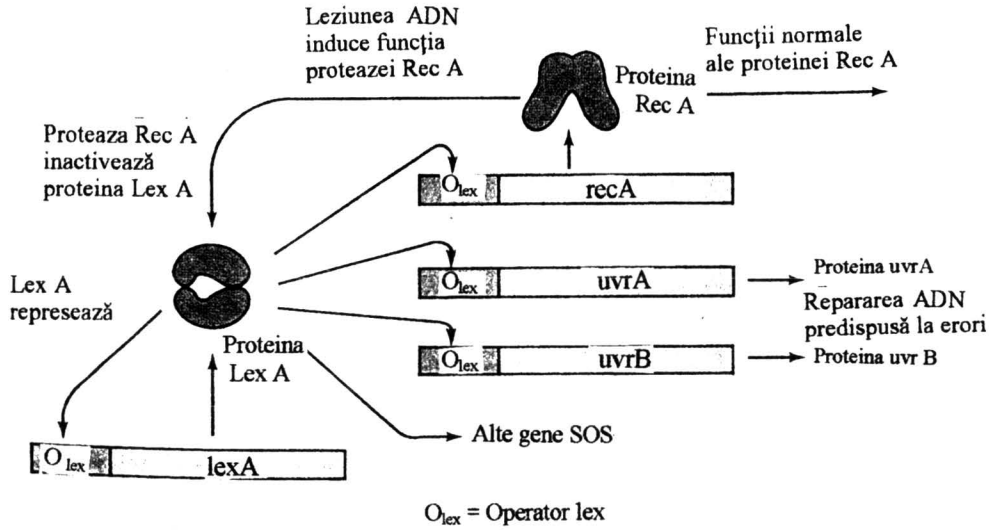


Fig. 214. Mecanismul raspunsului "SOS". Leziunea moleculei de ADN determină conversia proteinei *Rec A* într-o protează care clivează proteina *Lex A*. Proteina *Lex A*, în condiţii normale represează activităţile genei *rec A* şi ale genelor de reparare *uvr A* şi *uvr B* . După inactivarea proteinei *Lex A*, aceste gene se activează (după Brock, 1988).

În absenţa proteinei *Rec A*, proteina *Lex A* nu mai este clivată şi continuarea sintezei sale reface rezerva celulară. Proteina represor *Lex A* se leagă de regiunea operator a genelor sistemului "SOS" şi blochează transcrierea lor, inclusiv a genei *lex A*. Celula revine astfel, la starea normală, neindusă.

Semnificaţia biologică a sistemelor de reparare

Existenţa mai multor mcanisme de răspuns la leziunile moleculei de ADN este consecinţa acţiunii agenţilor fizici şi chimici, care pot afecta structura şi funcţia ADN.

Numărul leziunilor inactivatoare a unui genom, cu radiaţii UV sau X creşte odată cu complexitatea genomului.

Procesele reparatorii sunt avantajoase într-un mediu în care acţionează factori care induc mutaţii cu o frecvenţă mare, pentru menţinerea stabilităţii genetice a organismului, dar pe de altă parte nu permit apariţia şi exprimarea unor mutaţii, esenţial pentru evoluţia sistemelor vii.

Rata evoluţiei unei specii ar putea fi cuplată cu capacitatea de discriminare a sistemelor de reparaţie a ADN şi cu eficienţa acţiunii lor.

2. Elementele genetice transpozabile ale bacteriilor şi transpoziţia

Elementele genetice transpozabile (EGT) sunt entităţi genetice individualizate, bine delimitate, reprezentate de segmente specifice de ADN, care se pot desprinde din inserţiile lor şi se reintegrează în alte situsuri ale genomului celular. EGT sunt fragmente mobile de ADN, care se deplasează dintr-o poziţie în alta a aceluiaşi replicon sau între repliconi diferiţi. Existenţa EGT a fost dedusă după descoperirea unei forme de mutaţie necunoscută până în anii '6o: Lederberg a descris mutantele gal⁻ la *E. coli*. Frecvenţa reversiei (de $1/10^6 - 10^8$) nu a crescut după tratarea celulelor cu agenţi mutageni, ceea ce denotă că aceste mutaţii nu au fost nici deleţii, nici mutaţii punctiforme. Dacă mutaţia se produce într-o genă proximală (în raport cu secvenţa operatoare) a operonului, ea exercită efecte polare intense asupra genelor situate distal faţă de gena mutantă. Noul tip de mutaţie s-a numit *mutaţie polară*. Concluzia a fost că mutaţiile cu efect polar intens, rezultă prin inserţia unei secvenţe de ADN, la situsul mutaţiei.

Caracteristica generala a EGT este că toate au capacitatea de *a transpoza*, adică de a se insera la diferite situsuri, fără omologie genetică, pe acelaşi sau pe un alt replicon.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Apariţia efectelor polare se datorează faptului ca EGT conţin secvenţe care semnifică *terminarea*, atât în etapa transcrierii cât şi a traducerii. Rareori, transcrierea depăşeşte situsul de inserţie a EGT. De aceea, dacă nu există un promotor la cealaltă extremitate a EGT, care să reiniţieze transcrierea, restul genelor operonului rămân netranscrise.

Se cunosc 4 clase de EGT:

a) secvenţele de inserţie (SI) şi transpozonii compuşi (micşti)

b) transpozonii complecşi

c) bacteriofagii transpozanţi (fagii lambda şi *Mu*)

d) transpozonii conjugativi.

Secvenţele de inserţie (SI) şi transpozonii (Tn) nu au existenţa autonomă, ci se găsesc numai în stare integrată în structura unui replicon, ca segmente lineare de ADN, cu extremităţi bine definite, în timp ce fagii prezintă o faza liberă, extracelulară.

Termenul de *transpoziţie* (sau translocaţie) semnifică schimbul unui segment de ADN între genomuri neomologe sau între regiuni neomologe ale aceleiaşi molecule de ADN. Fenomenul transpoziţiei se materializează prin apariţia unui segment de ADN cu o lungime definită, într-o localizare genomică nouă, în care anterior nu a fost detectat. Caracterul mobil al EGT este reflectat în diferitele denumiri propuse: gene călătoare, elemente mobile, gene care sar, vehicule genetice autopropulsate etc. S-au denumit gene egoiste, deoarece funcţia unora dintre ele este numai aceea de a se replica, fără să codifice o proteină detectabilă.

Elementele genetice transozabile s-au identificat iniţial la porumb (McClintock, 1952), sub denumirea de *elemente de control*. Ele controlează activitatea (trecerea în poziţia de start sau de stop), a genelor pigmentare a seminţelor de porumb. Descoperirea a venit prea devreme, ideile au fost considerate erezii în raport cu dogma dominantă şi nu au fost luate în consideraţie. Interesul pentru EGT a fost redeşteptat odată cu evidenţierea lor în structura genomului bacterian. EGT se găsesc la organisme foarte diferite ca poziţie sistematică (bacterii, levuri, porumb, *Drosophyla*) şi probabil au o răspândire unversală în lumea vie, iar la bacterii par a fi ubicvitare. S-au descris la *E. coli, Citrobacter, Salmonella, Shigella, Pseudomonas, Klebsiella, Rhizobium, Staphylococcus, Haemophilus, Bacillus*.

Secvenţele de inserţie

Secvenţele de inserţie (SI) sunt cele mai simple elemente transpozabile descrise la bacterii. Ele conţin circa 1000 bp, deşi unele sunt mai mici (IS_1 conţine 769 bp) sau mai mari (1531 bp pentru IS_{50}). Secvenţele de inserţie nu conţin nici o genă cunoscută şi nu au nici o altă funcţie în afară de cea de replicare.

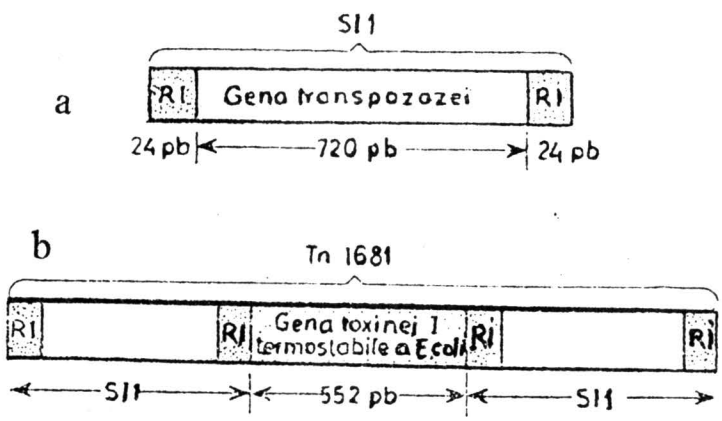


Fig. 215. a. Reprezentarea schematică a secvenţei de inserţie SI_1, care conţine gena enzimei transpozază, răspunzătoare pentru mobilitatea ei, flancată la cele două extremităţi de secvenţele repetate invers.
b. Transpozomul Tn_{1681}, cu gena codificatoare a toxinei termostabile de *E. coli*, încadrată de SI_1

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

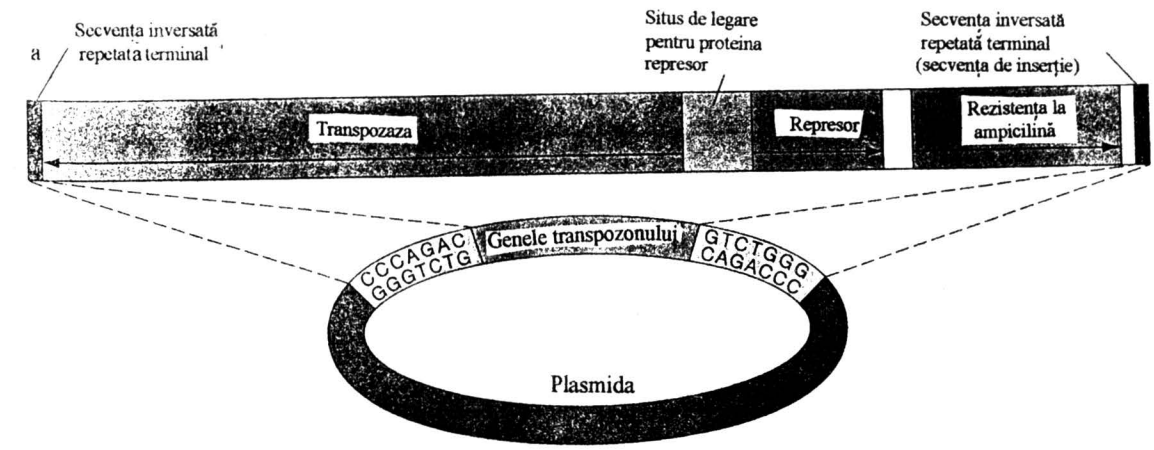
Toate SI sunt alcătuite dintr-o regiune centrală, codificatoare pentru funcţia de transpoziţie, mediată de *transpozază* (enzima care catalizează excizia acestor secvenţe din situsul de inserţie). Regiunea centrală este flancată la ambele extremităţi, de secvenţe terminale mai scurte, repetate în ordine *directă,* (secvenţe repetate în aceiaşi ordine la extremităţile unui segment de ADN, pe aceiaşi catenă) sau în ordine *inversată* (secvenţa nucleotidelor în direcţia 5'→ 3' pe una din catenele segmentului de ADN este aceiaşi pe catena complementară, în aceiaşi direcţie 5'→ 3', la capătul opus.

G T C G C A G A G		G T C G C A G A G
C A G C G T C T C		C A G C G T C T C
Secvenţe terminale directe	Secvenţe nucleotidice interne	Secvenţe terminale directe
C C C A G A C		G T C T G G G
G G G T C T G		C A G A C C C
Secvenţe terminale inversate	Secvenţe nucleotidice interne	Secvenţe terminale inversate

La *E. coli* s-au descris mai multe tipuri de SI: IS_1 – IS_4, IS_{10}, IS_{50}, IS_{901}, IS_{236}. Secvenţele de inserţie nu se replică autonom. O secvenţă de inserţie se desprinde din inserţia sa şi se deplasează la un alt situs pe cromosom, în oricare din cele două orientări posibile. Sunt *elemente genetice criptice*, adică prezenţa lor nu este detectabilă fenotipic, ci este dedusă indirect, prin mutaţiile pe care le generează. Integrarea unei SI într-o genă, suprimă funcţia genei respective şi rezultă *o mutaţie*. Dacă gena face parte dintr-un operon, integrarea SI în structura genetică a unui operon produce *efecte polare severe*.

Transpozonii compuşi (micşti)

Transpozonii compuşi sunt segmente de ADN mobile (cu potenţial de transpoziţie), care includ în alcătuirea lor, o serie de *gene structurale*, delimitate la extremităţi de SI, totdeauna repetate în ordine inversată. Mărimea lor variază între 2100 – 9300 bp. Din punctul de vedere al structurii genetice, Tn micşti sunt asemănători cu SI, dar se deosebesc de acestea prin faptul că în secvenţa centrală, poartă gene a căror expresie fenotipică este decelabilă şi conferă proprietăţi noi celulei purtătoare (de exemplu, gene de rezistenţă la Km, Cm, Tc etc.). Genele structurale sunt flancate de secvenţe repetate lungi (1-2 kb), cel mai adesea în ordine inversată. Secvenţele inversate conferă o stabilitate superioară structurii Tn.



b

SRI	Transpozaza	Situs „res"	Rezolvaza	Beta-lactamaza	SRI

Fig. 216. a. Structura unui transpozon compus, component al unei plasmide, flancat de secvenţe repetate invers. În afară de gena pentru transpozază, transpozonul compus conţine gena pentru proteina represor, care blochează transcrierea genei pentru transpozază şi gena de rezistenţă la un antibiotic. b. Structura genetică a unui transpozon complex. Rezolvaza este enzima care ligaturează capetele şi completează discontinuităţile celor două catene în procesul transpoziţiei. Situsul "res" cuprinde secvenţa la nivelul căreia, cele două structuri cointegrate în timpul transpoziţiei, se separă (după Bennett, 1998).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transpozonii complecşi

Transpozonii complecşi – grupaţi în familia Tn1 au până la 2o kb, dar au fost descrişi alţii mult mai mari (80 kb). Secvenţa de transpoziţie şi secvenţele specifice sunt flancate de secvenţe repetate invers scurte (40 pb), ca şi IS.

Interesul pentru studiul transpozonilor s-a amplificat odată cu descoperirea faptului că genele de rezistenţă la antibiotice pot să treacă de la un replicon la altul. De exemplu, gena pentru beta-lactamază este foarte mobilă, trecând cu uşurinţă de pe o plasmidă pe alta, ceea ce explică răspândirea largă a rezistenţei bacteriene la antibioticele beta-lactamice.

Transpozoni conjugativi

Din punct de vedere funcţional, transpozonii conjugativi sunt molecule himere, deoarece au proprietăţi de transpozoni, de plasmide şi de fagi. Transpozonii conjugativi sunt elemente de transfer genic, care contribuie la răspândirea rezistenţei la antibiotice. Se găsesc la cocii Gram pozitivi şi la *Bacteroides* sp. Sunt secvenţe de ADN, în mod obişnuit integrate în genomul bacterian şi au funcţie de transpoziţie care se desfăşoară în mai multe etape: excizia şi formarea unui intermediar circular închis covalent, ce se poate integra în genomul aceleiaşi celule (transpoziţie intracelulară) ori se transferă prin conjugare, la o celulă receptor şi se integrează în genomul ei (transpoziţie intercelulară).

Transpozonii conjugativi se aseamănă cu transpozonii propriu-zişi, pentru că se excizează şi se integrează în ADN, dar după un mecanism diferit. Diferenţa constă în existenţa unui intermediar dublu catenar închis covalent. Se aseamănă cu plasmidele prin existenţa intermediarului dublu catenar închis covalent, transferabil prin conjugare, dar spre deosebire de plasmide, intermediarul nu se replică. La *Streptomyces* sp. se găsesc plasmide, care la unele gazde se integrează în cromosom, iar la altele se replică fizic autonom. Aceiaşi situaţie pare a fi valabilă şi pentru transpozonii conjugativi. Conjugarea poate fi considerată ca o modalitate de replicare, pentru că Tn circular monocatenar ce rămâne în celula donor şi copia monocatenară transferată la receptor, sunt convertite prin replicare, la forma dublu catenară.

Prin capacitatea lor de excizie şi integrare, Tn conjugativi se aseamănă cu fagii, care de asemenea au un intermediar circular, dar în contrast cu fagii, Tn conjugativi nu asamblează particule structurale.

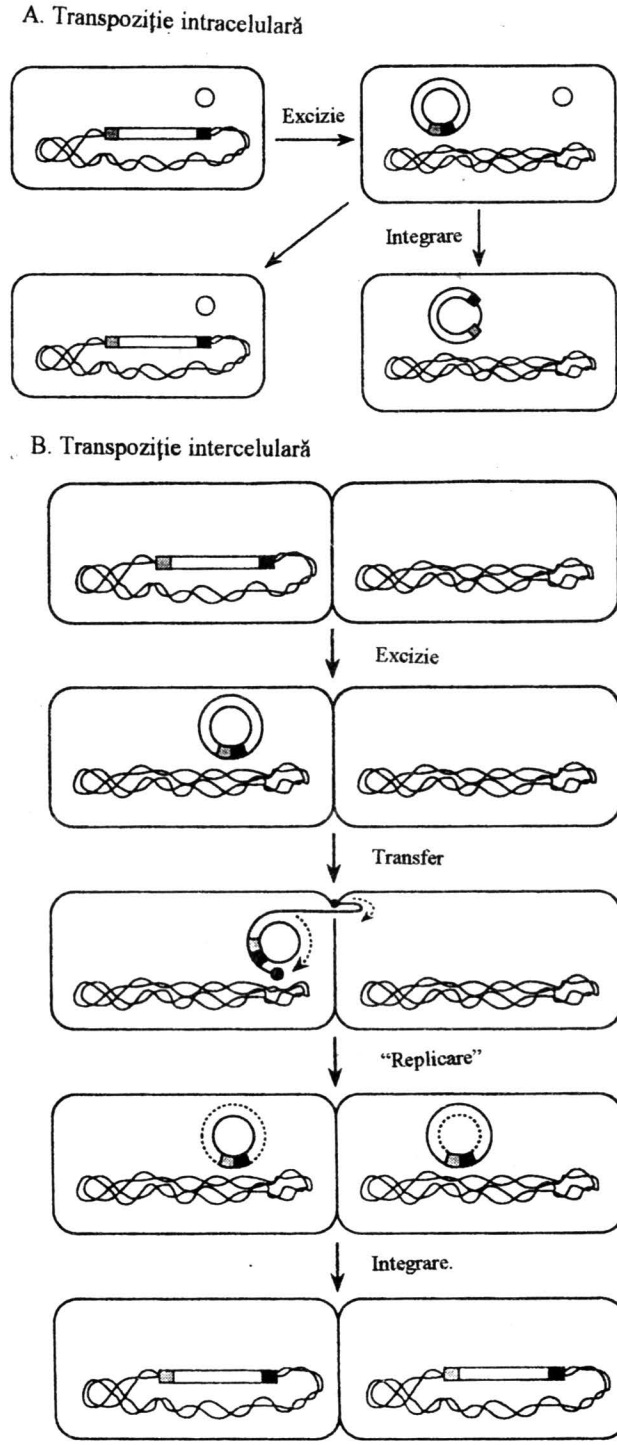
Transpozonii conjugativi se transferă prin conjugare şi s-au descris la *E. faecalis, S. pneumoniae*, dar şi la *N. gonorrhoeae*. Tn_{916} se transferă între bacteriile Gram pozitive şi Gram negative.

Bacteriofagi transpozanţi

Fenomenul trasnpoziţiei este cunoscut pentru fagul *Mu-1* (*Mu*tator), care infectează celulele de *E. coli* K_{12}. După infecţie, *Mu-l* poate urma o cale lizogenă sau calea litică. Capul este icozaedric, iar coada cu simetrie helicală, este prevăzută cu cele 6 fibre ale plăcii bazale. Molecula de ADN are 39 kbp, dar numai 37,2 kbp formează genomul, deoarece ambele capete ale moleculei de ADN, conţin secvenţe ale cromosomului bacterian.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 217. A. Treptele transpoziției intracelulare a unui transpozon (Tn) conjugativ. Forma integrată a Tn conjugativ se excizează și formează un intermediar circular, dublu catenar, închis covalent. Extremitățile formei integrate a Tn conjugativ sunt marcate prin pătrate pline. Forma circulară excizată nu se replică, dar se poate reintegra în cromosom sau într-o plasmidă. B. Treptele transpoziției intercelulare a unui Tn conjugativ. Forma integrată se excizează și formează intermediarul de transfer, circular, covalent închis. Forma circulară este clivată la *ori T* și o catenă este transferată printr-un proces similar transferului plasmidial (după Salyers și colab., 1994).



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Evenimentul comun pentru evoluţia litică sau lizogenă este *inserţia sa ca profag* în cromosomul celulei. Inserţia nu pare a avea situsuri specifice, ci se face aleatoriu, producând mutaţii cu o frecvenţă foarte mare. Mai mult, genomul fagic integrat (profagul) se deplasează continuu în diferite situsuri cromosomale, reintegrându-se în oricare din cele două orientări posibile. Replicarea litică a fagului şi lizogenia sunt variante ale fenomenului de transpoziţie.

După ce ADN *Mu-1* este injectat în celulă, se sintetizează o transpozază specifică *Mu-1*, care catalizează transpoziţia genomului în cromosomul celulei.

In celulele cu evoluţie lizogenă, transpoziţia este conservativă, iar în cele care urmează o evoluţie litică, Mu-l suferă cicluri repetate de traspoziţie replicativă.

Fagul *Mu-1* produce o varietate de rearanjări ale cromosomului bacterian. Mutaţiile sunt rezultatul efectului polar intens, ce constă în inactivarea tuturor genelor operonului situate distal faţă de punctul de inserţie, în raport cu secvenţa promotor.

Particularităţile ciclului de replicare a fagului *Mu-1* au fost clarificate numai după descoperirea elementelor genetice transpozabile.

Pentru evoluţia litică, genomul ADN *Mu-1* este excizat sub acţiunea unei nucleaze fagice. ADN fagic este excizat cu 10-150 de baze la stânga faţă de capătul stâng al genomului, iar la capătul din dreapta, 500 – 3000 de nucleotide îşi au originea în cromosomul gazdei. Se sintetizează proteine virale şi se asamblează virioni progeni.

Fagul *Mu-1* este considerat a fi un transpozon de tip special, de dimensiuni mari, ce codifică nu numai enzima de transpoziţie (transpozaza), ci şi toate proteinele necesare asamblării şi morfogenezei capsidei.

Situsul transpoziţiei nu are specificitate, genomul fagic integrându-se la diferite situsuri ale cromosomului bacterian.

Secvenţele de nucleotide care flanchează genomul fagic se pierd totdeauna prin clivare, înainte de integrarea sa în cromosomul bacterian.

Integronii

Integronii sunt sisteme de diseminare a genelor bacteriene, distincte de plasmide şi de EGT.

Integronii sunt secvenţe de ADN ce au proprietatea de recombinare cu specificitate de situs. Ei mediază deplasarea unor scurte secvenţe de ADN, denumite *casete genice* (Recchia şi Hall, 1995). Cele mai multe casete genice cuprind o singură genă de rezistenţă la antibiotice.

Frecvent, integronii fac parte din structura unor transpozoni, dar au o distribuţie mai largă.

O casetă genică poate exista în două forme:

- ca o secvenţă lineară într-un integron
- ca o moleculă circulară de ADN, dublu catenară, ce poartă 1-2 gene de rezistenţă şi un situs de recombinare (att) de 59 de nucleotide, cu rolul de a integra caseta genică la situsul specific al unui replicon.

Secvenţele 5' şi 3' care flanchează caseta genică lineară, sunt bine conservate. Regiunea 5' conţine gena *int*, codificatoare a *integrazei*, o enzimă de recombinare la situs specific, iar la capătul 3' se găseşte gena de rezistenţă la un antibiotic.

Fig. 218. Structura genetică a unui integron. Secvenţă *att* mediază recombinarea la situs specific. Gena *sul* codifică rezistenţă la sulfonamide (după Recchia şi colab., 1995).

Integrarea unei casete genice într-un replicon este reversibilă. Caseta excizată se integrează în alt replicon. Prin intermediul casetelor genice, complementul genelor de rezistenţă poate fi mereu rearanjat şi deplasat de pe un replicon pe altul.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transpoziţia

Transpoziţia semnifică excizia EGT din situsul sau de integrare într-un replicon şi inserţia într-un alt situs al aceluiaşi sau al altui replicon. Integrarea EGT se realizează prin procese de *recombinare nelegitimă*, datorită absenţei omologiei genetice cel puţin pe o lungime considerată ca minimă, între cele două secvenţe ale ADN recombinant. Recombinarea are loc independent de produsul genei *rec A*, mediatorul recombinării genetice între secvenţe omologe de baze.

Transpoziţia este un fenomen rar, datorită concentraţiei foarte mici de transpozază în celulă. De exemplu, Tn_{10} codifică sinteza unei singure molecule/celulă/generaţie. Transpoziţia sa are loc, în medie, o dată la 10^7 generaţii celulare.

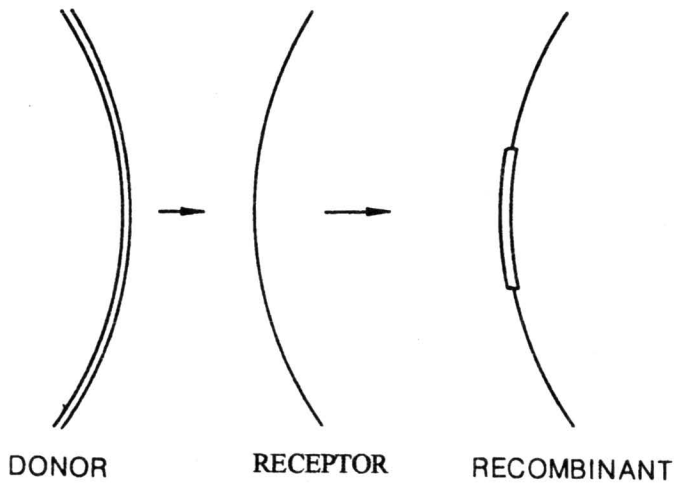


Fig. 219. Reprezentarea schematică a procesului de transpoziţie. Secvenţa din molecula donor este reprezentată prin linia dublă, iar molecula receptor – prin linie simplă.

Mecanismul molecular al transpoziţiei este ipotetic. Transpozaza se sintetizează imediat după replicarea ADN. Transpoziţia este asociată în timp, cu momentul sintezei transpozazei. Unele EGT (de exemplu, genomul fagului λ) se integrează numai la situsuri cromosomale bine determinate, aşa numitele "zone calde" ale transpoziţiei. Altele (de exemplu, IS_1) se inseră aproape la orice situs cromosmal, deşi preferă anumite secvenţe. Ca şi enzimele de restricţie, transpozonii recunosc secvenţe palindromice de 4-6 perechi de baze.

Transpozonii sunt excizaţi cu precizie la extremităţile inserţiei lor în replicon. Aceasta presupune ca transpozaza să recunoască ambele extremităţi ale transpozonului. Moleculele de transpozază leaga ambele extremităţi ale transpozonului, precum şi secvenţa de baze a repliconului receptor. Molecula acceptoare este clivată decalat, după mecanismul de acţiune a enzimelor de restricţie. Simultan se produce un clivaj monocatenar al extremităţilor transpozonului, pe catenele opuse, astfel încât transpozonul are o catenă liberă la fiecare capăt. Capetele libere sunt scurte duplicări ale ADN receptor (5-9 pb), ce flanchează secvenţa transferabilă. Aceste duplicări completează secvenţele clivate decalat ale repliconului receptor, la nivelul cărora este inserat Tn.

După legarea monocatenară a fiecarei extremităţi a EGT la situsul receptor, fenomenul transpoziţiei poate urma una din următoarele două căi:

a) Modelul *transpoziţiei conservative sau simple* presupune că transpozaza produce al II-lea set de secţiuni la cele două capete ale transpozonului. Rezultatul este transferul transpozonului intact la noul situs.

Continuitatea catenelor repliconului receptor este restabilită de ADN-ligază. Discontinuitatea catenelor repliconului nu mai este reparată şi molecula este degradată de nucleaze. Transpoziţia simplă implică numai ruperea şi reunirea catenelor repliconului receptor şi deplasarea EGT la un nou situs;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

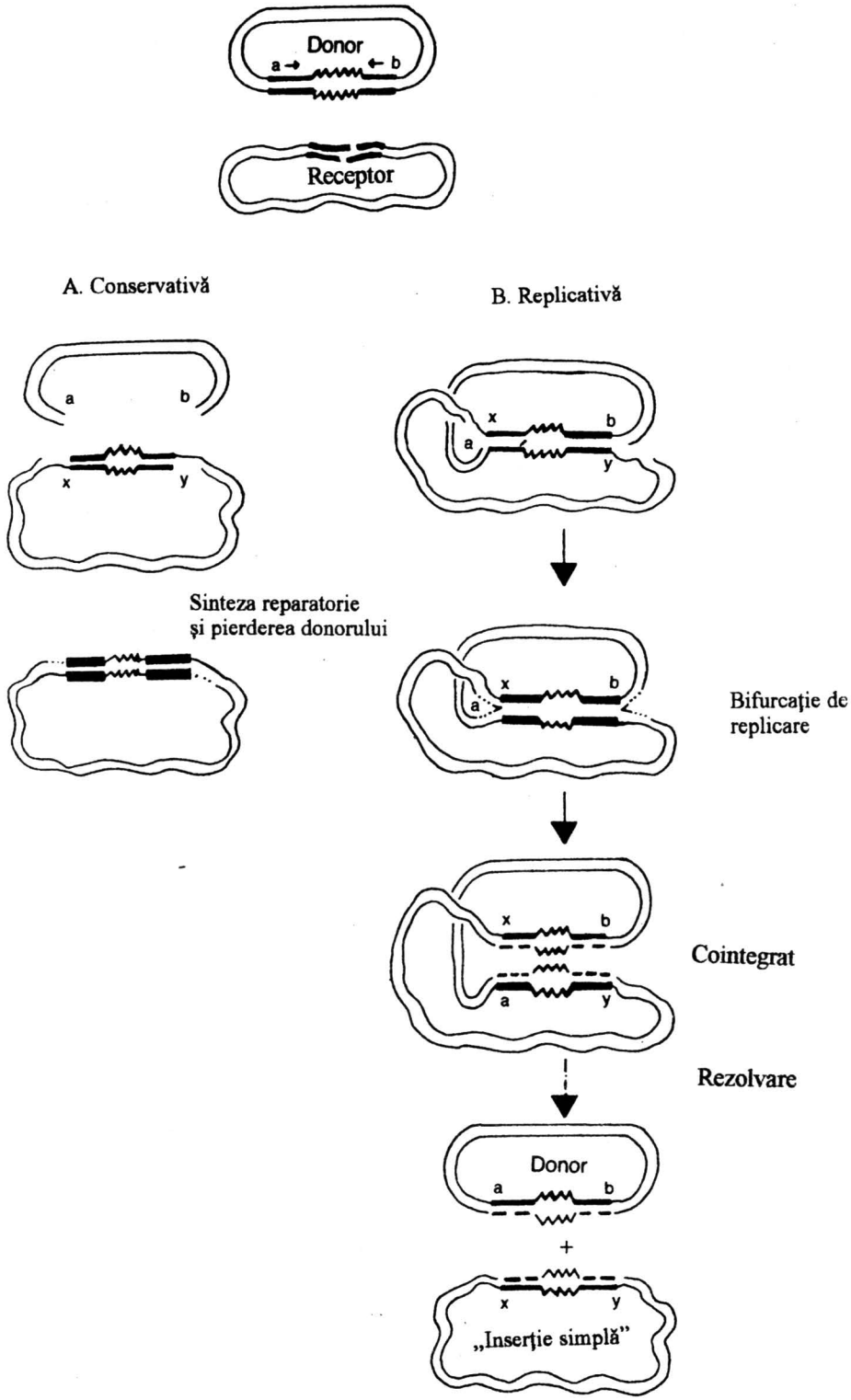


Fig. 220. Modelul molecular al transpoziţiei. A. Transpoziţia conservativă (simplă). B. Transpoziţia replicativă, cu formarea unei structuri intermediare cointegrate. Unii transpozoni se separă din structura cointegrată, sub acţiunea "rezolvazei", enzima care secţionează şi leagă capetele celor doi repliconi. Alteori, repliconii fuzionează într-o structură unică. Liniile groase între *a* şi *b* delimitează transpozonul, în repliconul donor; linia în zig-zag semnifică secvenţele terminale repetate; x, y = situsurile de clivare în cei doi repliconi. Alte amănunte, în text (după Davis, 1990).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

b) Modelul *transpoziţiei replicative* presupune că în momentul transpoziţiei, EGT este replicat: o copie a sa este transpozată la situsul receptor, iar cea de a II-a rămâne la situsul original al repliconului donor. Cea de a II-a serie de secţiuni a catenelor EGT, nu mai are loc, iar cei doi repliconi fuzionează şi formează o *structura cointegrată*.

În procesul fuziunii, fiecare catenă a EGT este copiată integral şi se formează două copii ale EGT. Ulterior, cei doi repliconi se separă, dar fiecare poartă cate o copie a EGT, sau rămân fuzionaţi într-o structură unică. Prin procesul transpoziţiei replicative a unui EGT dintr-o plasmidă într-o altă plasmidă, urmat de fuziunea celor doi repliconi, se formează o plasmidă mai mare, stabilă, cu câte o copie a EGT la ambele puncte de joncţiune.

Modelul transpoziţiei replicative pare a fi cel mai probabil. Transpoziţia nu constă într-un schimb de material genetic, ci în dobândirea unui EGT.

Deşi transpoziţia EGT este rezultatul unor procese de recombinare nelegitimă, totuşi fenomenul are loc între secvenţe cu un grad variabil de omologie a bazelor, între slabă şi moderată. Face excepţie fagul λ, care se inseră cu specificitate înaltă, la situsuri omologe, existente atât în cromosomul de *E. coli* (att B), cât şi în cel fagic (attP).

La bacterii, cele mai multe EGT se deplasează (transpozează) foarte rar (odată la 10^5 – 10^7 generaţii celulare) şi de aceea se diferenţiază greu de componenta imobilă a cromosomului.

La levuri, la plante, la protistele eucariote, la *Drosophyla* şi la procariote s-au găsit EGT, a căror transpoziţie se face după un mecanism similar ciclului de multiplicare a retravirusurilor. Prima treaptă a transpoziţiei este transcrierea EGT într-o copie de ARN, de peste 5000 de baze. Această copie codifică sinteza enzimei reverstranscriptază, care la rândul ei catalizează sinteza unei copii de ADN dublu catenară, circulară, pe matriţa de ARN. ADN circular se integrează într-un situs cromosomal, cu specificitate de secvenţă a bazelor. Integrarea ADN este catalizată de o transpozază, codificată de copia de ARN. De aici derivă denumirea de *retrotranspozoni* sau *retropozoni* pentru aceste EGT. Ele au, în special, importanţă teoretică, deoarece sugerează posibila origine şi evoluţie a retravirusurilor. Singura deosebire între retravirusuri şi retropozoni pare să conste în absenţa învelişului viral.

Consecinţele transpoziţiei

Procesele de transpoziţie produc o multitudine de rearanjări genetice. Nu numai că deplasează diferite gene de la un situs la altul, dar transpoziţia produce diferite macroleziuni: mutaţii, deleţii, inversiuni etc. Situsurile inserţiei EGT sunt "zone calde" pentru astfel de modificări genetice. Inserţia elementelor transpozabile perturbă invariabil integritatea genei în interiorul căreia s-a făcut transpoziţia.

Inserţia unui Tn într-un situs nou, prin efectele sale polare produce frecvent o mutaţie. Efectele polare se produc pentru că elementele transpozabile sunt, în general, entităţi genetice de sine stătătoare şi adeseori semnifică terminarea traducerii şi/sau transcrierii. De aceea, transcrierea operonului rareori progresează dincolo de punctul de inserţie a Tn, în absenţa unui promotor la capătul terminal, care să orienteze transcrierea dincolo de secvenţa TN, restul genelor operonului, situate în aval de situsul de inserţie, vor rămâne netranscrise (Bennett, 1998).

Mutaţiile prin deleţie survin ca urmare a exciziei incorecte a transpozonului, împreună cu secvenţe cromosomale.

Cea mai cunoscută mutaţie datorată unei *inversiuni* a secvenţei cromosomale este cea care determină fenomenul "variaţiei de fază", descris la *Salmonella*. Flagelii conţin proteina H_1 sau H_2, cu specificitate antigenică distinctă, niciodată ambele. Schimbările compoziţiei chimice, de la H_1 la H_2 sau invers, se produc cu o frecvenţă de circa 1 la 1000 diviziuni celulare, cu mult peste rata mutaţiei spontane. Fenomenul se datorează inversiilor cromosomale, al căror rezultat este exprimarea alternantă a genei *h*, în cele două orientări (h_1 sau h_2). Când segmentul de ADN codificator are orientare directă, se sintetizează proteina H_1, iar sinteza proteinei H_2 este represată. După inversiunea segmentului de ADN codificator, se sintetizează proteina H_2, iar sinteza proteinei H_1 este represată.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transpozonii au rolul unor "comutatori" pentru genele adiacente situsului de inserţie: în raport cu situsul integrării, într-o direcţie se iniţiază transcrierea, iar în direcţia opusă, ori o inhibă, ori produc terminarea ei prematură.

Transpozonii pot avea consecinţe funcţionale favorabile pentru celulă, prin introducerea genelor noi.

Un alt efect al transpoziţiei este *fuziunea repliconilor*. Un transpozon inserat într-o plasmidă, va uşura integrarea ei ulterioară în cromosomul celulei, flancată fiind de două copii ale transpozonului. Un exemplu în acest sens, este generarea liniilor *Hfr* (*H*igh *f*requency of *r*ecombination) la *E. coli*, după integrarea factorului F în cromosom. Fuziunea repliconilor poate să fie rezultatul transpoziţiei sau al unui crossing-over între EGT cu secvenţe omologe, existente în ambii repliconi.

Datorită existenţei elementelor genetice transpozabile, genomul bacterian a dobândit potenţialul unei remarcabile *plasticităţi genetice*.

Descoperirea plasmidelor a condus la ideia "genomului bacterian colectiv", suprapus celui individual, reprezentat de cromosom, decurgând din caracterul transmisibil al acestora cu o frecvenţă mare, de la o celulă la alta.

Anterior descoperirii EGT, se considera că mutaţiile şi recombinările genetice omologe ("legitime") erau suficiente pentru a genera diversitatea lumii bacteriene în mediile naturale. Descoperirea lor a evidenţiat faptul că prin mobilitatea foarte accentuată, EGT sunt promotorii recombinărilor "nelegitime". Acestea se produc cu o frecvenţă mult mai mare decât recombinările pe baza omologiei genetice, sporind astfel diversitatea mecanismelor de control genetic al proceselor fiziologice şi permiţând o mai eficientă adaptare a celulei bacteriene la condiţiile variabile ale mediului de viaţă.

3. Mecanisme de transfer al materialului genetic la bacterii

Transferul informaţiei genetice la bacterii semnifică trecerea unui fragment de ADN de la celula donor la celula receptor.

Cele mai cunoscute mecanisme de transfer a informaţiei genetice la bacterii sunt: *transformarea genetică, conjugarea, sexducţia, transducţia, transfecţia şi fuziunea de protoplaşti*.

Transferul materialului genetic presupune traversarea barierelor celulare, de două ori: o dată la ieşirea din celula donor şi a II-a oară, la intrarea în celula receptor. Numai în cazul conjugării, cele două trepte ale transferului sunt corelate direct. In cazul transformării genetice, sau al proceselor de transfer de gene mediate de fagi, eliberarea ADN din celula donor şi pătrunderea sa în celula receptor sunt procese separate în timp.

Transferul de gene la bacterii are două particularităţi distincte:

1. *Lipsa fuziunii* celulelor participante la schimbul genetic, cu excepţia fuziunii de protoplaşti;

2. *Contribuţia cantitativă inegală* a celor două celule: celula receptoare participă cu întregul genom, iar fragmentul de ADN al celulei donoare este strict limitat ca mărime. Datorită acestui fapt, la sfârşitul transferului, celula receptoare este *parţial şi temporar diploidă* (merodiploidă), pentru acea parte a genomului său care este omologă fragmentului exogen, primit de la celula donoare. Transferul este *unidirecţional*: de la celula donoare, la cea receptoare.

In cazul transformării, conjugării şi fuziunii protoplaştilor, se transferă gene cromosomale sau/plasmidiale. Prin transducţie şi transfecţie se transferă gene fagice, dar şi gene bacteriene încorporate în genomul fagic.

Foarte adesea, după transfer, ADN exogen este degradat de enzimele celulare de restricţie. Dacă ADN exogen se circularizează repede, devine rezistent la acţiunea enzimelor, iar dacă se replică repede, cele două celule surori primesc câte o copie. Există însă posibilitatea rară (1-2%), ca ADN exogen să fie încorporat în structura cromosomului receptor printr-un proces de recombinare genetică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transformarea genetică

Transformarea genetică este o modalitate de transfer a informaţiei genetice de la o bacterie donoare la una receptoare, prin intermediul unui fragment de ADN (o fracţiune a ADN total al celulei donoare), eliberat prin mecanisme fizice (plasmoliză), prin extracţie chimică sau pe cale enzimatică.

Procesul transformării genetice s-a descris la *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus sp., Bacillus subtilis, Neisseria sp., Rhizobium sp., Salmonella sp., Yersinia sp., Azotobacter sp.* etc. şi s-a demonstrat că are loc atât intraspecific cât şi interspecfic şi chiar între genuri diferite de bacterii.

Transformarea propriu-zisă este un eveniment rar şi este rezultatul integrării fragmentului de ADN exogen, în genomul celulei receptoare prin procesul recombinării şi a exprimării fenotipice a noilor determinanţi genetici pe care îi conţine.

Fenomenul transformării genetice a fost descoperit de Griffith (1928). El studia variabilitatea caracterelor de cultură la pneumococ (*Str. pneumoniae*), o bacterie care se prezintă sub forma unui diplococ, capsulat sau necapsulat. Pe baza compoziţiei chimice şi a specificităţii serologice a polizaharidelor capsulare, există circa 80 de tipuri distincte. De exemplu, polizaharidele capsulare de tip II sunt polimeri de acid galacturonic, galactoză, N-acetil-glucozamină şi fucoză, iar cele de tip III sunt polimeri de glucoză şi acid glucuronic. Sinteza acestor polizaharide este codificată de gene diferite. Celulele capsulate de pneumococ sunt virulente, iar cele necapsulate sunt nevirulente (după inocularea într-un organism sensibil nu produc simptome de îmbolnăvire). Celulele capsulate cresc pe suprafaţa unui mediu solidificat, sub forma unor colonii *netede (S, S*mooth), iar cele necapsulate, produc colonii *rugoase (R, R*ough). Prin cultivarea tulpinilor capsulate şi virulente (de tip S) în prezenţa serului imun specific, se obţin variante necapsulare, avirulente, care cresc sub forma coloniilor R. Mutantele S → R apar cu o frecvenţă mult superioară mutantelor R → S. Modificarea tipului de colonie se face totdeauna în cadrul aceluiaşi tip biochimic de polizaharid, fără modificarea tipului serologic.

Griffith a observat că, uneori, după inocularea intraperitoneală la şoarece a unei cantităţi mari de suspensie celulară a unei tulpini R, animalele mor. Din sânge se izolează celule care, pe mediul solidificat cresc sub forma colonii lor S, adică sunt celule capsulate. El a dedus că, de cele mai multe ori, celulele care formează colonii de tip R păstrează o cantitate mică de material polizaharidic, care se acumulează pe suprafaţa unor celule, iniţial necapsulate. Vor rezulta astfel celule capsulate, virulente, ce determină moartea animalelor de experienţă.

Pentru a-şi verifica ipoteza, Griffith a inoculat un număr mic de celule vii dintr-o tulpină R a tipului serologic II, avirulente, în amestec cu o cantitate mare de celule ale tulpinii S de tip serologic III, omorâte prin caldură. Inoculate separat, nici una din cele două tulpini bacteriene nu produce moartea animalelor. Amestecul celular produce infecţia mortală la şoarece, iar din sânge se izolează pneumococi vii de tip III. Aparent, această experienţă a confirmat ipoteza de lucru a autorului: apariţia pneumococilor capsulaţi şi virulenţi ar fi rezultatul transferului polizaharidului de pe suprafaţa celulelor capsulate omorâte, pe suprafaţa celulelor vii ale tulpinii R.

Experienţele lui Griffith au fost reluate de Avery şi colab. (1944). Ei au demonstrat că la baza procesului de transformare genetică, stă transferul unor determinanţi genetici, prin intermediul unui *fragment de ADN*, care conferă celulei receptoare, capacitatea de a codfica polizaharidele capsulare. Sinteza materialului capsular determină apariţia corelativă a celorlalte particularităţi: tipul coloniei (S sau R), virulenţa. In acelaşi mod pot fi transferaţi şi alţi determinanţi genetici: cei care determină rezistenţa la un antibiotic, sau care codifică sinteza unei enzime cu rol în metabolismul celular.

În experienţele lui Griffith, deoarece mutanta R II de pneumococ, trece într-o mutantă S III este evident că un fragment de ADN al mutantei S III a fost transferat şi s-a exprimat în celulele mutantei R II, permiţând sinteza materialului capsular de tip serologic III şi chiar activarea sintezei materialului de tip II.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cercetările diferitelor variante serologice patogene de pneumococ au evidenţiat că virulenţa este o expresie cantitativă a gradului de patogenitate. In timp ce patogenitatea este o caracteristică de specie, gradul de virulenţă a bacteriilor patogene, poate să varieze de la *avirulent* până la *hipervirulent*, trecând prin trepte intermediare.

Procesul de transformare genetică a fost studiat pentru reprezentanţii mai multor genuri. Pentru ca transformarea să aibă loc, sunt necesare câteva condiţii:

- ADN transformant trebuie să aibă greutatea moleculară între 1-20 kD;
- fragmentul de ADN trebuie să fie dublu catenar. ADN monocatenar nu este încorporat în celulă sau încorporarea este ineficientă;
- numărul celulelor transformate creşte odată cu concentraţia ADN în mediu, până la nivelul de saturare (1-20 μg ADN/ml cultură bacteriană competentă, ceea ce corespunde la 100-200 fragmente de molecule de ADN/celulă);
- să existe un grad de omologie genetică între ADN transformant şi o anumită secvenţă a cromosomului celulei receptoare. Astfel se explică frecvenţă superioară a recombinărilor genetice pentru transformările intraspecifice şi scăderea frecvenţei lor, pe măsură ce se accentuează diferenţele de structură genetică;
- acceptarea ADN şi transformarea sunt condiţionate de o anumită stare fiziologică a celulei receptoare, denumită "stare de competenţă", cu o durată variabilă.

Produsele genice necesare transformării sunt clasificate în două grupe;

a) proteinele genelor timpurii, cu rolul de a determina starea de *competenţă*;

b) proteinele târzii necesare pentru legarea, prelucrarea ADN şi asamblarea mecanismelor de translocaţie a ADN.

Competenţa defineşte capacitatea unei celule bacteriene de a accepta un fragment de ADN exogen, ca o consecinţă a unei permeabilităţi crescute a structurilor de suprafaţă. Starea de competenţă limitează foarte mult frecvenţa procesului de transformare, pentru că, deşi ADN este adesea disponibil (din celulele lizate într-o cultură), transformarea este condiţionată de starea fiziologică a celulelor acceptoare.

Starea de competenţă poate fi *naturală* (fiziologică) sau *artificială* (indusă). La unele bacterii, competenţa naturală este *permanentă*, iar la altele este *temporară*. Celulele competente în mod natural, înglobează ADN într-o formă rezistentă la DN-ază, la sfârşitul fazei de creştere exponenţială, după care competenţa diminuă rapid.

Competenţa *naturală* este uneori, dependentă de factori difuzibili (denumiţi *factori de competenţă*), iar alteori depinde de stări particulare ale învelişului celular, consecinţă a sintezei unor proteine de membrană, a unor autolizine etc. Starea de competenţă naturală implică, în primul rând, existenţa receptorilor celulari pentru ADN şi s-a descris la *S. pneumoniae, B. subtilis, H. influenzae, A. vinelandii, Neisseria sp., Pseudomonas sp., Rhizobium sp., Xanthomonas sp.*

La *B. subtilis*, starea de competenţă este tranzitorie şi se instalează la sfârşitul fazei de creştere exponenţială, într-un mediu minimal. In faza de competenţă, numai 10% din celulele unei populaţii devin competente pentru transformare, probabil ca o consecinţă a unei reglări individuale la nivel celular. Heterogenitatea competenţei ar putea reprezenta chiar un dimorfism sexual primitiv: cele necompetente elimină ADN, iar cele competente îl înglobează. Starea de competenţă la *B. subtilis* este asociată cu scăderea ratei sintezei ADN, cu sinteza unor proteine specifice localizate în membrana citoplasmatică. Competenţa este o stare fiziologică temporară şi reversibilă.

La *Str. pneumoniae*, competenţa este deasemenea tranzitorie şi este reglată de un *factor solubil de competenţă*, o proteina de 10 kD, componentă a membranei, care se sintetizează când cultura atinge o densitate de 10^8 celule/ml. O celulă competentă are circa 50 de situsuri de legare a ADN. O moleculă mare de ADN, se asociază cu câteva situsuri celulare.

Bacteriile Gram negative nu sintetizează factori de competenţă, starea fiind reglată prin mecanisme metabolice interne şi este indusă în condiţii de deficit nutriţional, asociate cu încetinirea sau limitarea creşterii. Toate celulele unei culturi devin competente şi starea este menţinută în medii care limitează creşterea.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La *Neisseria sp.* şi la alţi gonococi, starea de competenţă este constitutivă şi permanentă, nefiind dependentă de stadiul culturii şi nici de sinteza factorilor de competenţă.

Competenţa artificială este indusă de concentraţiile relativ mari de cationi bivalenţi, tris sau PEG. Celulele de *B. subtilis* devin competente în faza staţionară, în prezenţa ionilor de Mg^{2+} şi Ca^{2+}. De obicei, se folosesc combinaţii ionice de $CaCl_2$ (30 mM) şi $MgCl_2$ (26 mM).

O metodă eficientă de inducere a stării de competenţă, este *electroporarea*, ce constă în permeabilizarea învelişurilor celulare şi uşurarea înglobării ADN exogen, sub acţiunea stimulilor electrici.

Mecanismul molecular al transformării genetice

Mecanismul molecular al transformării genetice a fost descris la *B. subtilis, Streptococcus* sp., *Haemophilus* sp. Transformarea genetică este produsă numai de moleculele de ADN dublu catenare, lineare, în timp ce ADN monocatenar, ARN, hibrizii ADN-ARN sau ADN circular închis, nu sunt legate pe suprafaţa celulelor competente. Procesul transformării poate fi împărţit în trei etape:

- legarea moleculei de ADN pe suprafaţa celulei şi fragmentarea ei;
- înglobarea (transportul ADN prin învelişurile celulei);
- stabilizarea ADN transformant, fie ca replicon autonom, fie prin recombinare cu un replicon rezident.

Mecanismul transformării este asemănător la bacteriile Gram pozitive şi la cele Gram negative, dar există diferenţe ale etapelor de legare şi înglobare, datorate diferenţelor structurale majore ale peretelui celular.

Intr-o primă etapă, fragmentul de ADN exogen este *adsorbit reversibil*, consecinţă a unei interacţiuni laxe. Peretele celulelor Gram pozitive are o sarcină netă pozitivă, iar ADN are o sarcină electrică negativă. Din această cauză, adsorbţia ADN este rapidă. Faza adsorbţiei reversibile durează 4-5 secunde. Molecula de ADN poate fi îndepărtată prin spălare rapidă.

Faza de legare "strânsă" sau de *adsorbţie ireversibilă*, corespunde ancorării ferme a moleculei de ADN, la câteva situsuri din cele circa 50 ale celulei receptoare.

La *B. subtilis*, în legarea ADN exogen este implicată o proteină complexă de 75 kD, asociată membranei, sintetizată sub acţiunea factorului de competenţă. Proteina de legare este formată din două polipeptide echivalente ca mărime, una dintre ele având activitate nucleazică. Este o endonuclează, denumită *translocază*. Ambele faze ale legării sunt nespecifice, deoarece celulele de *B. subtilis* pot să lege fragmente de ADN de provenienţă străină (de exemplu, ADN de mamifer).

Bacteriile Gram negative (*Haemophilus sp., N. gonorrhoeae*) leagă preferenţial ADN homolog. Pe suprafaţa membranei externe a celulelor competente, se diferenţiază vezicule membranare specializate, cu rolul de a îngloba şi de a proteja ADN exogen în timpul intrării sale în celulă. Specificitatea bacteriilor Gram negative pentru înglobarea ADN homolog este condiţionată de secvenţele repetate de nucleotide în ADN şi de interacţiunea acestor secvenţe, cu situsurile receptoare de suprafaţă.

Transportul ADN prin învelişul celular (înglobarea) este puţin înţeles. Pătrunderea ADN exogen în celula receptoare se face sub formă *monocatenară*. Studiile cu molecule marcate radioactiv au evidenţiat o înjumătăţire a radioactivităţii în interiorul celulei, ceea ce sugerează că transportul

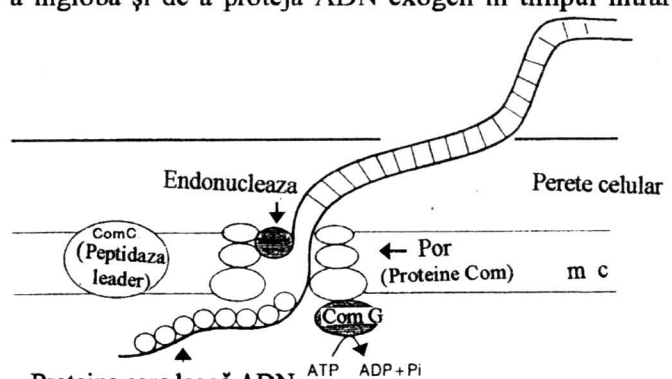


Fig. 221. Modelul molecular al transformării genetice la bacteriile Gram pozitive. Canalul transmembranar este probabil format de proteinele de competenţă. În timpul trecerii prin membrana citoplasmatică, o catenă a ADN dublu catenar exogen este degradată de o endonuclează asociată membranei (după Dreiseikelmann, 1994).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ADN se face sub formă monocatenară şi în timpul transportului, catena complementară este degradată complet. Înglobarea implică incizia unei catene a ADN exogen, la sau lângă situsurile de legare la membrană. Incizia are loc în prezenţa ionilor bivalenţi (Mg^{2+}, Ca^{2+}) şi este catalizată de nucleaza din complexul de 75 kD. Urmează incizii succesive monocatenare, astfel încât una din catenele de ADN exogen este degradată complet.

Înglobarea ADN monocatenar în celula receptoare pare a fi rezultatul acţiunii endonucleazei, localizată asimetric pe membrană, denumită *translocază*. Transportul pare a avea loc printr-un canal membranar, format prin modificarea conformaţiei spaţiale a nucleazei. La *B. subtilis*, înglobarea ADN necesită forţa proton-motrice şi nu hidroliza ATP.

ADN monocatenar este protejat de acţiunea nucleazelor în timpul transportului, prin formarea unui complex cu o proteină specifică de legare, sintetizată în intervalul de competenţă.

La bacteriile Gram negative (*Haemophilus sp., N. gonorrhoeae*), ADN exogen este legat şi transportat în vezicule membranare specializate denumite *transformasomi*, cu diametrul de 20 nm, în număr de 10-12/celulă, localizate la situsurile de aderenţă dintre membrana externă şi cea internă. Sunt alcătuiţi în special, din componentele membranei externe. In transformasom, ADN este protejat de acţiunea DN-azei exogene şi de endonucleazele celulare de restricţie.

Adăugarea ADN dublu catenar, la suspensia de celule competente de *H. parainfluenzae*, are ca efect internalizarea rapidă (3 minute) a veziculelor, de la suprafaţa externă, spre latura citoplasmatică. La ieşirea din vezicula de transport, o catenă a ADN exogen este complet degradată.

ADN înglobat de celulele competente, poate fi izolat sub forma fragmentelor monocatenare de circa 10 kb.

Stabilizarea ADN monocatenar transformant, este consecinţa unui proces de recombinare. ADN monocatenar este protejat de acţiunea nucleazelor, de o proteină specifică sintetizată în faza de competenţă, *proteina SSB* (*S*ingle *S*trand *B*inding).

Integrarea ADN monocatenar exogen în cromosomul celulei receptoare, este catalizată de enzime şi este dependentă de proteina *Rec A* (produsul genei *rec A*), printr-un proces de recombinare. Rezultatul final al recombinării, este o moleculă hibridă (heteroduplex). Fragmentul de ADN monocatenar exogen se împerechează pe baza complementarităţii bazelor, cu o regiune omologă a cromosomului. Se formează un complex ADN exogen-ADN receptor. Recombinarea propriu-zisă are loc prin deplasarea fizică şi înlocuirea uneia din catenele ADN receptor. Deplasarea catenei este însoţită concomitent, de degradarea ei şi a altor molecule de ADN exogen transformant. Dacă nu există o omologie cu ADN cromosomal, ADN heterolog exogen este degradat complet.

Reacţia de schimb între ADN cromosomal şi ADN exogen este condiţionată de proteina *Rec A*. Acţiunea proteinei *Rec A* constă în alinierea celor două molecule de ADN, pe baza complementarităţii nucleotidelor, într-o reacţie dependentă de ATP. Alinierea este urmată imediat de formarea "buclei D", în care ADN monocatenar invadează ADN dublu catenar rezident. Recombinarea parcurge următoarele trei etape:

1. *Polimerizarea* proteinei *Rec A* pe molecula de ADN monocatenar. *In vitro*, proteina *Rec A* şi ADN monocatenar formează un filament nucleoproteic, evidenţiat la microscopul electronic.

2. *Sinapsa*. In prezenţa ATP, nucleoproteina formează un complex cu ADN cromosomal. Interacţiunea iniţială nu se produce între secvenţele de bazele omologe. Cele două molecule de ADN se deplasează una faţă de alta, astfel încât secvenţele omologe vin în contact direct şi se aliniază pe baza omologiei nucleotidelor.

3. *Schimbul post-sinaptic*. Catenele omologe, aliniate dar neîmperecheate, se leagă instabil. Proteina *Rec A* deplasează o catenă a moleculei dublu catenare şi catalizează integrarea catenei exogene, cu consum de energie, furnizată prin hidroliza ATP. Proteina *Rec A* are acţiune de helicază şi produce despiralizarea ADN dublu catenar. Integrarea ADN este polarizată în direcţia 5' → 3'.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

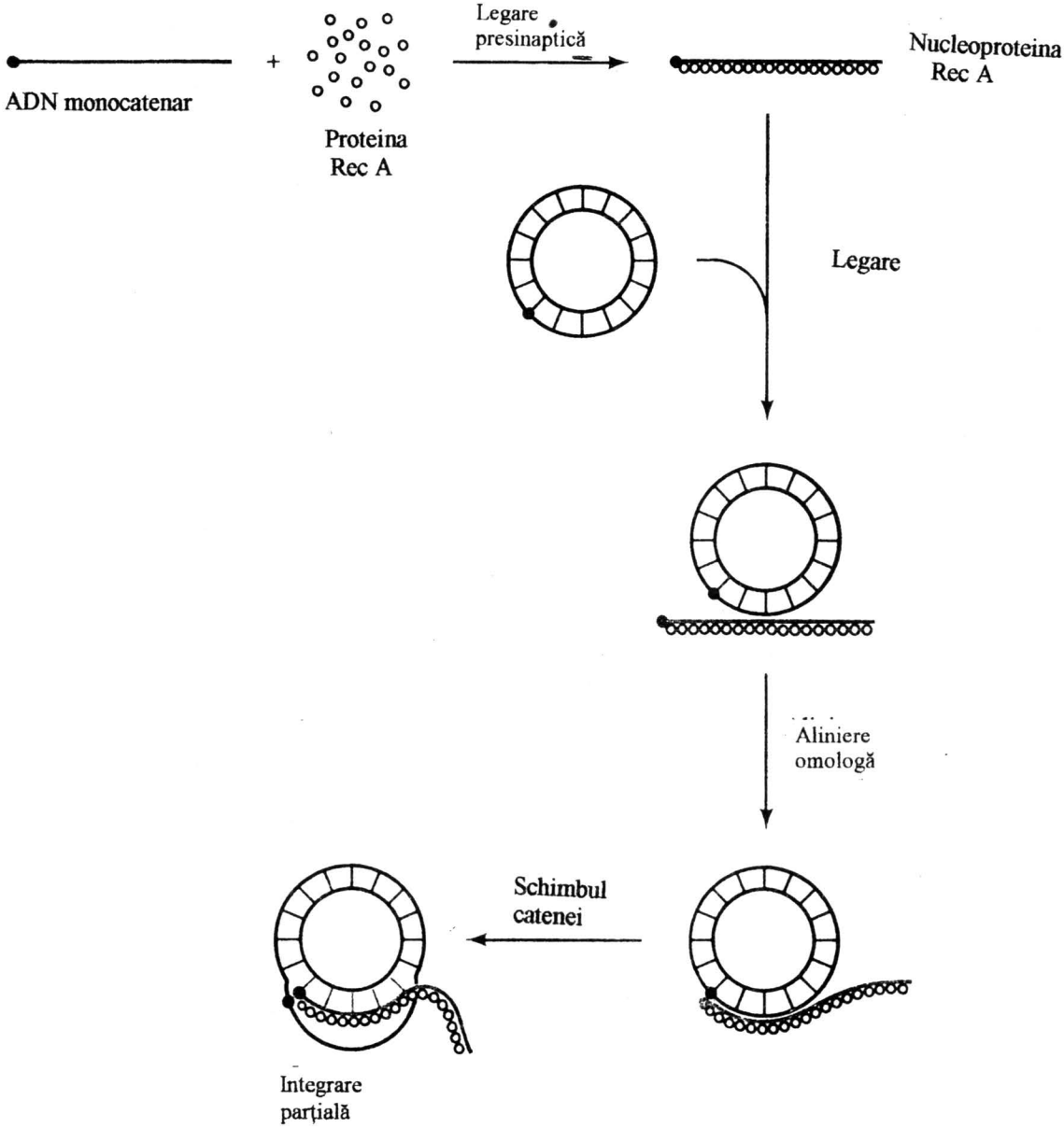


Fig. 222. Etapele procesului de recombinare a secvenţelor omologe, dependentă de proteina Rec A (după Freifelder, 1992).

La *Str. pneumoniae*, rolul proteinei *Rec A* pare a fi îndeplinit de SSB. Catena înlocuită este secţionată. *Nucleazele* secţionează capetele libere ale ADN exogen şi endogen, iar *ligaza* repară inciziile. Se formează un heteroduplex, în care unele baze sunt împerecheate greşit. Rezultatul recombinării, adică menţinerea sau eliminarea ADN exogen în genomul celulelor progene, depinde de repararea împerecherilor greşite.

Unii markeri transformă celulele cu o eficienţă foarte înaltă. Imperecherile de baze greşite ori sunt corectate eficient şi aduse la nivelul secvenţei de baze a ADN exogen, ori corectarea este nesemnificativă. Pentru markerii care au eficienţă transformantă scăzută, mecanismele de reparare a bazelor împerecheate greşit sunt foarte active. Sunt îndepărtate bazele ADN exogen şi celula păstrează fenotipul conferit de ADN propriu. Dovada pentru validitatea acestei concluzii a fost adusă de izolarea mutantelor defective pentru repararea bazelor împerecheate greşit. La aceste mutante, toţi markerii de transformare au eficienţă foarte înaltă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fenomenul recombinării este rar, având loc în circa 1% din totalul evenimentelor de înglobare a ADN exogen. De cele mai multe ori, ADN exogen nu se poate recombina datorită fenomenului de restricţie, un adevărat mecanism de imunitate moleculară, prin care ADN străin este recunoscut şi eliminat.

Există două tipuri de ADN, care după înglobarea în celula competentă, nu necesită integrarea: ADN *plasmidial şi fagic*. Neavând omologie a bazelor faţă de ADN cromosomal, nu se integrează, ci rămân ca repliconi în stare fizic autonomă.

Studiile de transformare s-au făcut cu ADN cromosomal (pentru markerii specifici) şi cu ADN plasmidial pentru markerii de rezistenţă la antibiotice. Se înregistrează apariţia coloniilor prototrofe şi respectiv a celor rezistente la antibiotice, pe mediile adecvate. Transformarea cu ADN fagic se înregistrează sub forma plajelor de liză pe o pânză de celule sensibile şi nu depinde de prezenţa secvenţelor de baze omologe. Este o transformare independentă de capacitatea celulei de a face recombinare omologă.

Transformarea cu ADN plasmidial sau fagic are loc cu o frecvenţă foarte mică şi necesită cooperarea unui mare număr de copii moleculare, echivalent la circa 10 000 echivalenţi ai genomului fagic şi 1000-10 000 molecule de ADN plasmidial, pentru un eveniment de transformare.

Dimensiunea medie a ADN integrat în celulele de *B. subtilis* s-a estimat la 8-10 kb. Fiecare celulă poate integra 10 molecule de 8-10 kb fiecare, ceea ce coresunde la circa 100 de gene de dimensiuni medii.

Transformarea genetică, descoperită în laborator, este un fenomen care se desfăşoară cu mare probabilitate şi în condiţii naturale, în mediile în care se realizează populaţii bacteriene foarte dense şi unde au loc procese de liză celulară, prin care se eliberează fragmente de ADN: liza fiziologică, liza fagică sau sub acţiunea substanţelor antibiotice. Fragmentele de ADN sunt preluate de alte celule prin mecanismul transformării, asigurând o variabilitate genetică cu o frecvenţă semnificativă.

Conjugarea bacteriană

Conjugarea este o modalitate de transfer de material genetic de la o celulă donoare, la una receptoare, prin intermedul unei legături celulare directe. Procesul este condiţionat de existenţa, în celula donoare, a unei plasmide cu funcţie de *conjugon* (transferon sau plasmidă conjugativă), care trebuie să codifice structurile necesare realizarii contactului celular, iar pe de altă parte, să pregătească transferul în celula receptoare, adică să fie o *plasmidă mobilizabilă*. Absenţa uneia sau a ambelor funcţii, semnifică existenţa plasmidelor neconjugative şi/sau nemobilizabile.

Plasmidele *conjugative sau plasmide de sex* sunt factorii *F*, la care se adaugă unele plasmide *R* şi unele plasmide *Col*.

Fenomenul conjugării bacteriene a fost descoperit de Lederberg şi Tatum (1944). Ei au remarcat că tulpinile dublu auxotrofe complementare de *E. coli* K_{12}, după cultivarea în amestec în mediu nutritiv lichid, generează celule prototrofe[x], care cresc pe un mediu solidificat minimal şi produc colonii.

De la tulpinile prototrofe, sub acţiunea mutagenă a radiaţiilor UV, se obţin mutante nutriţionale, denumite *auxotrofe* (auxein = străin), care au drept caracter marcant, incapacitatea de a face sinteza uneia sau mai multor substanţe necesare (esenţiale). Prin urmare, substanţa ce nu poate fi sintetizată, trebuie adăugată mediului de bază, ca o condiţie obligatorie pentru ca bacteria respectivă să se poată dezvolta. Substanţele adăugate pentru a suplini incapacităţile de sinteză se numesc *factori de creştere*.

---

[x] Tulpina de *E. coli* K_{12} este *prototrofă*, adică face sinteza tuturor constituienţilor chimici, ceea ce îi permite să crească şi să se multiplice pe medii minimale, care nu conţin factori de creştere (vitamine, aminoacizi). Se mai numesc şi tulpini de tip sălbatic, deoarece, din punct de vedere metabolic corespund celor existente în natură.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lederberg şi Tatum au utilizat în experienţele lor, tulpini mutante *dublu auxotrofe* şi *triplu auxotrofe*, cu incapacitatea de a sintetiza *treonina, leucina, tiamina, biotina, fenil-alanina* şi *cisteina*. Aceste incapacităţi de sinteză au fost luate ca markeri genetici pentru analiza ulterioară.

În exprienţa crucială, autorii au urmărit comportarea a două tulpini mutante – A şi B – triplu auxotrofe, dar selecţionate astfel încât cele trei incapacităţi de sinteză ale tulpinii A să fie complementate de tulpina B şi invers (sunt tulpini auxotrofe complementare).

	thr^+, leu^+, thi^+		thr^-, leu^-, thi^-
Tulpina A	bio^-, phe^-, cis^-	Tulpina B	bio^+, phe^+, cis^+

Cultivate izolat, pe mediul minimal, cele două tulpini bacteriene nu cresc (nu formează colonii). În experienţa propriu-zisă de conjugare, cele două tulpini bacteriene (câte 10^8 celule din fiecare), au fost puse în contact pentru un interval, în mediul lichid şi ulterior au fost însămânţate pe mediul minimal solidificat. După 24 de ore se înregistrează apariţia coloniilor *prototrofe*. In experienţa de control, cultivarea tulpinilor A şi B, separate, pe mediul minimal, nu generează apariţia coloniilor.

Toate coloniile crescute pe mediul minimal, din punct de vedere genetic sunt prototrofe: thr^+, leu^+, thi^+, bio^+, phe^+, cis^+, ca şi cum cele două tulpini auxotrofe au făcut schimb de material genetic.

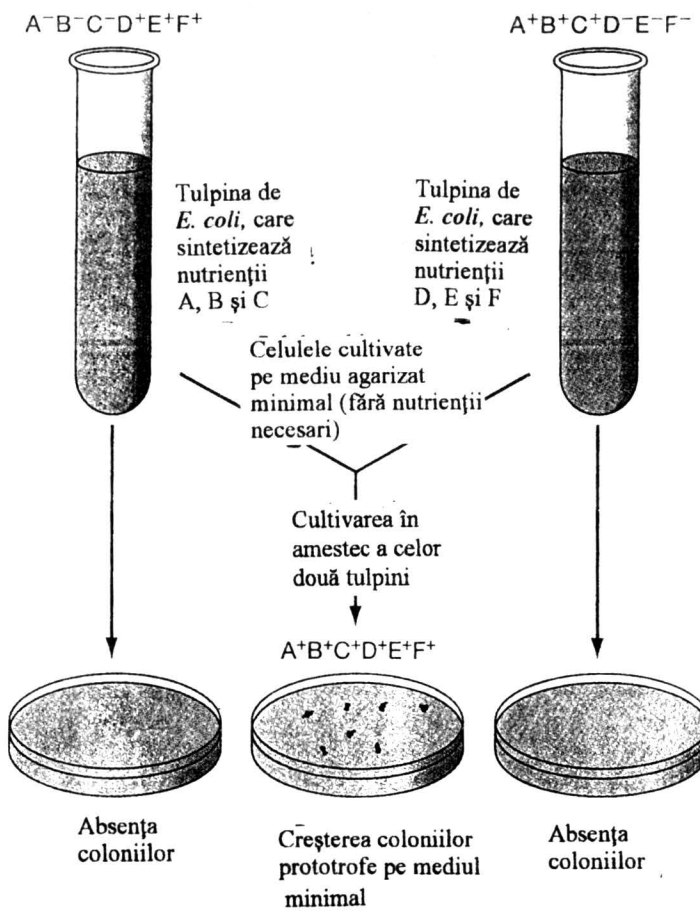


Fig. 223. Reprezentarea schematică a experimentului iniţial al lui Lederberg, care a condus la descoperirea procesului de conjugare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru a explica originea celulelor prototrofe s-a emis ipoteza retromutației. Ideia a fost abandonată, deoarece studiile referitoare la rata retromutațiilor în experiențe de acest tip, au demonstrat că ele sunt fenomene rare, care se produc cu o frecvență de $1/10^{-7}$ celule/24 de ore pentru un singur caracter, ceea ce denotă că pentru trei caractere, rata statistică a producerii retromutației, este de $1/10^{-21}$ celule/24 de ore, practic imposibilă datorită caracterului triplu auxotrof al mutantelor.

Ipoteza reversiei la prototrofie prin transformare genetică, a fost eliminată prin experiența cultivării celor două tulpini triplu auxotrofe, într-un tub în forma literei U. Cele două brațe ale tubului sunt separate printr-o membrană poroasă, permeabilă pentru moleculele mediului de creștere, dar care nu permite trecerea celulelor dintr-un braț în celălalt al tubului. Atâta timp cât celulele celor două tulpini sunt fizic separate, reversia la prototrofie nu se realizează. Singura explicație pentru geneza mutantelor prototrofe, în experiența evocată, rămânea posibilitatea unui *contact celular direct*, argumentată și de imagini la microscopul electronic, care sugerează acest fapt.

Determinismul genetic al procesului de conjugare

Conjugarea este condiționată de prezența în celula donor, a plasmidei F, care conține determinanții genetici *tra* (circa 28 de gene), secvențele ori T, la care se inițiază originea transferului. Cel puțin alte 11 gene sunt necesare pentru asamblarea pilului funcțional. Alte gene codifică sinteza pilinei, sinteza moleculelor de recunoaștere între celula donoare și receptoare, replicarea plasmidei.

Factorul F prezintă un grad important de omologie genetică cu cromosomul bacterian, în special pentru genele *tra*. Pe această bază s-a emis ipoteza că la origine, genele factorului F ar fi fost cromosomale, dar s-au desprins și au devenit autonome.

În funcție de prezența și de raportul plasmidei F cu cromosomul, există patru tipuri de celule, care se comportă diferit în procesul de conjugare:

- celulele F^- sunt acelea care nu au plasmidă F. În procesul de conjugare, ele sunt receptoare de material genetic. Sunt echivalenții genetici ai organismelor de sex feminin;
- celulele F^+ posedă plasmida de sex în stare fizic autonomă. In procesul conjugării, ele sunt donoare de material genetic. Sunt echivalenții genetici ai organismelor de sex masculin;
- celulele *Hfr* (*H*igh *f*requency of *r*ecombination) prezintă plasmida F integrată în structura cromosomului. Aceste celule au capacitatea de a realiza cupluri de transfer, urmate de recombinare genetică, cu o mare frecvență. Fiziologic sunt considerate a fi celule "supermascul", donoare de material genetic;
- celulele F' conțin un factor F modificat prin procesul de recombinare cu cromosomul. Factorul F are proprietăți episomale (se integrează, reversibil, prin recombinare cu cromosomul). După excizia incorectă, factorul F se desprinde împreună cu un mic fragment de ADN cromosomal și devine factorul F'. In procesul de conjugare, celulele F' se comportă ca și celulele F^+.

Etapele procesului de conjugare

Inițierea procesului de conjugare este condiționată de prezența pililor, structuri care se evidențiază după "marcajul" cu fagii care recunosc receptori piliari: la extremitatea liberă a pililor se găsesc receptori pentru fagii filamentoși, iar pe suprafața pilului, pe toată lungimea sa, se leagă fagii ARN "masculi", (de exemplu, MS_2). Flagelii sunt structuri mai lungi și ondulate, iar fimbriile nu au receptori pentru fagi.

După amestecul populațiilor de celule conjugante, în proporții corespunzătoare, între celule se produc contactele (ciocnirile) întâmplătoare, urmate de formarea unor *cupluri specifice* de perechi, care la început sunt instabile, adică se pot dispersa printr-o agitație ușoară.

Cuplurile instabile se formează prin legarea extremității libere a pilului de o suprafață receptoare a celulei F^-. Faza de legare instabilă este urmată uneori, după câteva secunde, de faza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de *legare stabilă*. Cele două celule sunt aduse în contact direct. Această fază corespunde formării perechilor eficiente. Asocierea celor două celule este mult mai rezistentă la acţiunea forţelor de dispersie. In această etapă are loc transferul propriu-zis al materialului genetic, probabil prin formarea unui *canal de conjugare*. Cuplurile de transfer eficient, se formează la circa 15 minute, de la amestecul celulelor în proporţii echivalente.

Rolul pililor în procesul de conjugare

Rolul pililor în procesul de conjugare este indiscutabil, fiind argumentat de mai multe fapte de observaţie:

- cultivarea bacteriilor în condiţii de mediu, în care numărul pililor scade foarte mult, diminuă corespnzător frecvenţa proceselor de conjugare;
- pilii sunt prezenţi numai la celulele care conţin o plasmidă cu funcţii conjugative;
- îndepărtarea pililor prin agitare mecanică, este însoţită de incapacitatea formării cuplurilor de conjugare, până când pilii se refac;
- blocarea suprafeţelor receptoare ale pililor cu fagi ARN "masculi" sau a extremităţii libere cu fagi ARN filamentoşi, diminuă sau anulează capacitatea de formare a cuplurilor de conjugare;
- pilul este un cilindru de 20 μm lungime, cu diametrul extern de 8 nm, iar cel intern de 2-2,5 nm, suficient pentru trecerea ADN monocatenar. Aranjarea moleculelor de pilină în structura pilului, este similară cu aceea a capsomerelor fagilor filamentoşi;
- la microscopul cu contrast de fază, se observă cupluri de celule care se deplasează sincron, separate de o distanţă fixă;
- la microscopul electronic cu baleiaj se observă structuri care leagă celulele cuplului.

Pentru rolul pilului în transferul de material genetic pledează rezultatele experienţelor de conjugare întreruptă. Dacă, după formarea cuplului, suspensia celulară este agitată şi pilul este rupt, lungimea fragmentului de ADN care a trecut în celula receptoare este direct proporţională cu durata existenţei pililor. Prezenţa ADN în lumenul pilului nu s-a demonstrat cu certitudine.

A II-a ipoteză consideră că pilii ar avea un rol esenţial în faza iniţială a procesului de conjugare, aceea a formării cuplurilor. Pilul ar avea rolul unui cârlig de "agăţare" a celulei receptoare, după care ar urma retracţia sa în celula donoare, printr-un proces de dezasamblare la bază. Există dovezi că interacţiunea finală între celulele cuplului este un canal de conjugare, asamblat de proteinele celulei donoare.

Studiul electrono-optic al unor celule Gram negative în medii seminaturale a evidenţiat un canal intercelular, delimitat de membrana citoplasmatică şi de peretele celular. Lumenul canalului are un conţinut de aceiaşi textură cu a materialului nuclear.

Fig. 224. Imaginea electrono-optică a unui posibil canal de conjugare la bacteriile Gram negative. Conţinutul canalului este asemănător nucleoplasmei, x 150 000 (original).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transferul ADN plasmidial în cuplul F^+ x F^-

Plasmidele conjugative pot să transfere o copie a lor, de la celula donoare la celula receptoare. Transferul plasmidei F se realizează cu o frecvenţă mare. De exemplu, dacă o singură celulă de *E. coli* F^+ se adaugă la o cultură de celule F^-, aflată în faza de creştere, după 15-20 de generaţii, o mare proporţie a celulelor conţine factorul F, ca urmare a transferului unei copii a plasmidei de la celula F^+ la celula F^-, fără ca factorul F să fie pierdut din celulele donoare. Fiecare celulă receptoare dobândeşte o plasmidă F şi la rândul ei devine donoare. Intre două diviziuni, o celulă F^+ realizează 1-2 transferuri, astfel că factorul F se răspândeşte repede în populaţia bacteriană receptoare. Fenomenul se numeşte "masculinizare epidemică" a celulelor F^-.

După formarea cuplurilor eficiente, transferul conjugativ al ADN are loc în trei etape:

- mobilizarea ADN pentru transfer
- transferul propriu-zis
- formarea unei plasmide funcţionale (cu capacitate de replicare în celula receptoare).

Etapele conjugării se succed numai dacă în celula donoare se găseşte o plasmidă *conjugativă* şi *mobilizabilă*. Plasmidele conjugative poartă gene ce determină formarea perechilor eficiente, iar cele mobilizabile pregătesc ADN pentru transfer. Plasmidele autotransmisibile (de exemplu, plasmida F), sunt atât conjugative cat şi mobilizabile.

O celulă poate avea două plasmide diferite: F şi Col E_1. Ultima este mobilizabilă, dar neconjugativă. Intr-un cuplu de conjugare, plasmida F poate suplini incapacitatea conjugativă a plasmidei Col E_1, astfel încât aceasta va fi transferată. Procesul în care o plasmidă neconjugativă este transferată într-un proces mediat de o plasmidă conjugativă, se numeşte *donaţie*.

O plasmidă conjugativă poate să medieze transferul unei plasmide nemobilizabile, sau chiar al genelor cromosomale. In cuplul de conjugare F^+ x F^- se transferă, cu o frecvenţă mică, gene cromosomale sau plasmide neconjugative. Fenomenul se numeşte *conducţie* şi defineşte procesul de mobilizare pasivă a oricărui replicon, inclusiv a cromosomului celulei F^+, prin intermediul Tn 1000. Conducţia este rezultatul recombinării genetice între cei doi repliconi, mediat de Tn 1000. Treapta intermediară a procesului de transpoziţie, este o structură cointegrată, în care cele două copii ale transpozonului au rolul unor punţi între cei doi repliconi. Transferul ADN cromosomal este iniţiat în stadiul de cointegrare a celor doi repliconi.

Mecanismul molecular al transferului factorului F

La nivel molecular, conjugarea şi transferul ADN sunt procese complexe, reglate de gene şi proteine multiple. Genele implicate în procesul conjugării sunt organizate într-un singur operon – *operonul tra* – organizat în circa 35 cadre de citire (ORF).

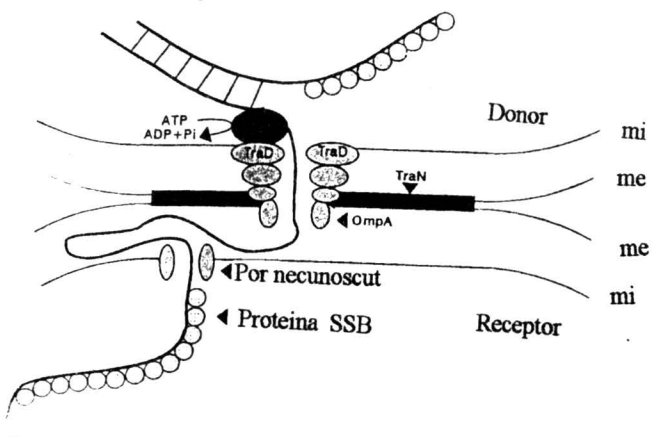


Fig. 225. Transferul ADN monocatenar al factorului F prin membranele celulei donor şi receptor în timpul conjugării. Canalul transmembranar al celulei donor ar putea fi asamblat din proteinele de transfer (după Dreiseikelmann, 1994).

După retractarea pilului şi formarea canalului de conjugare, are loc mobilizarea plasmidei F. Mobilizarea începe în momentul în care o proteină cu funcţie *nucleazică* – *proteina Tra* – codificată de plasmidă, realizează incizia unei catene, la o secvenţă unică de baze, denumită *originea de transfer* (ori T) şi rămâne legată covalent de capătul 5'P al catenei incizate. Proteina *Tra* are şi funcţie de *helicază* şi despiralizează plasmida F în timpul transferului conjugativ. Energia necesară pentru separarea catenelor este furnizată de hidroliza ATP.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mecanismul transferului conjugativ este ipotetic. În acord cu unul din mecanismele de transfer, incizia monocatenară declanşează replicarea plasmidei după modelul cercului simplu şi ramura lineară ce rezultă din replicare este transferată. Proteina *Tra*, legată la capătul 5'P are, probabil, rolul de protecţie a ADN linear monocatenar, de acţiunea nucleolitică şi este transferată concomitent cu ADN, în celula receptoare. Aceiaşi proteină ar avea şi rol de *ligază*, reunind capetele catenei lineare în celula receptoare.

Una din proteinele codificate de operonul *tra*, care însoteşte ADN în timpul transferului, este SSB. Ea tapetează ADN transferat, protejându-l de acţiunea endonucleazelor.

În cursul transferului, sinteza ADN se desfăşoară atât în celula donoare cât şi în celula receptoare. In celula donoare, sinteza conjugativă înlocuieşte catena ce se transferă, iar în celula receptoare, sinteza conjugativă converteşte ADN monocatenar transferat, la forma dublu catenară.

Un alt model al transferului consideră că proteina *Tra* rămâne în celula donor şi ADN trece în celula receptoare sub forma monocatenară circulară, care nu necesită protecţie faţă de acţiunea endonucleazelor.

Transferul ADN cromosomal în cuplul Hfr x F⁻

În celulele F^+, cu o frecvenţă mică, plasmida F se integrează în cromosomul bacterian, printr-un proces de recombinare. Situsul de recombinare a plasmidei F în cromosom nu este unic, dar predominant are loc în transpozonul IS_3, localizat la 94,5 kb pe harta fizică. Se cunosc peste 20 de situsuri majore ale cromosomului, la nivelul cărora poate avea loc integrarea plasmidei F. Afinitatea factorului F pentru fiecare situs este variabilă. Fiecare situs cromosomal este, probabil, o copie a lui IS_2, IS_3 sau sau a lui Tn 1000. Afinitatea semnifică probabilitatea schimbului de secvenţe nucleotidice cu aceste elemente. Factorul F se poate integra în orientare directă sau inversată.

Celula bacteriană purtătoare a factorului F integrat devine Hfr, deoarece are o capacitate foarte ridicată de a iniţia formarea cuplurilor de conjugare. Factorul F linear, integrat în cromosomul bacterian, îşi pierde capacitatea de replicare independentă şi este replicat odată cu genele cromosomale. Odată cu diviziunea celulei, factorul F este transmis pe verticală, tuturor celulelor, de la generaţie la alta. In stare integrată, factorul F nu mai este infecţios – nu se transmite pe orizontală prin conjugare – decât în mod excepţional, când conjugarea durează foarte mult.

O particularitate funcţională distinctă a bacteriilor Hfr, decurge din tendinţa foarte marcată de rupere a cromosomului. De aici rezultă capacitatea foarte crescută (de 100%) a cuplurilor de conjugare, de a transfera gene cromosomale. Genele transferate sunt diferite de la un cuplu de conjugare la altul, datorită numărului mare de situsuri cromosomale la care se poate face integrarea factorului F. Totdeauna sunt transferate genele în care s-a inserat factorul F.

Ruperea cromosomului se face, de regulă, la nivelul structurilor plasmidei, foarte aproape de una din extremităţile ei, astfel încât cromosomul linear care se generează, poartă la una din extremităţi, un mic fragment al plasmidei, iar restul se găseşte la extremitatea opusă. Rareori, incizia se face la limita dintre plasmidă F şi cromosom.

În funcţie de poziţia lor faţă de situsul integrării plasmidei F, fiecare genă cromosomală are şansa să fie transferată în celula receptoare.

Mecanismul transferului de material genetic în cuplul Hfr x F^- este foarte asemănător cu acela descris pentru transferul factorului F în cuplul de conjugare F^+ x F^-. Transferul este precedat de *incizarea* monocatenară a cromosomului, la nivelul plasmidei integrate. Incizia este produsă de *nucleaza* din complexul proteic de stabilizare. Punctul inciziei semnifică originea transferului. Din celula donoare se transferă ADN monocatenar. Concomitent cu transferul are loc replicarea cromosomului celulei donoare, după modelul cercului simplu. Catena rămasă în celula donoare funcţionează ca matriţă pentru sinteza unei noi catene. Rezultă astfel, o copie dublu catenară a ADN transferat. Nu se cunoaşte originea energiei de transfer, care deplasează catenă ADN din celula donoare în cea receptoare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cuplul Hfr x F⁻ se transferă un mic fragment al plasmidei F, gene cromosomale şi în mod excepţional se transferă o copie completă a factorului F (numai în cazurile în care conjugarea durează 90-120 de minute).

Transferul se iniţiază la circa 3 minute după amestecul celulelor conjugante şi progresează cu o rată constantă, cuprinsă între 45 000 – 100 000 nucleotide/minut şi este iniţiat la situsul *ori T* al factorului F integrat.

De cele mai multe ori, conjugarea se întrerupe datorită factorilor de mediu, la intervale variabile de timp. Din această cauză, în conjugare se transferă, de obicei, numai *gene cromosomale*. Nu se transferă factorul F şi celula rămâne F⁻. Factorul F se transferă numai dacă durata procesului de conjugare este de 90-120 minute, mult mai mare decât durata unei generaţii celulare. Faptul este explicabil prin aceea că, procesul conjugării stopează creşterea şi diviziunea celulelor cuplului.

Fragmentul de material genetic transferat are dimensiuni diferite, în raport cu durata procesului de conjugare. Celula receptoare a cuplului, după conjugare, este un *merozigot* (un zigot parţial şi temporar diploid). Dacă nu este degradat de enzimele de restricţie, fragmentul de ADN primit, se poate integra în cromosom, printr-un proces de recombinare genetică. Dacă ADN exogen poartă gene noi, după recombinare se exprimă în celula receptoare, care astfel dobândeşte caractere noi.

Rata uniformă de transfer a ADN în conjugare, face ca transferul conjugativ să fie instrumentul esenţial de lucru, pentru cartarea genetică a cromosomului.

De regulă, conjugarea se realizează între celulele aceleiaşi specii, dar are loc şi interspecific şi chiar intergeneric, dar cu o frecvenţă mai mică. De exemplu, *E. coli* formează cupluri de conjugare cu celule ale propriei specii, dar şi cu *Salmonella* sp., *Proteus mirabilis* etc.

Conjugarea la bacteriile Gram pozitive diferă de cea tipică bacteriilor Gram negative. Conjugarea este mediată de *feromonii de sex*, pe care îi sintetizează şi îi excretă celulele potenţial receptoare. Feromonii sunt molecule proteice de înveliş, care mediază aglomerarea şi formarea agregatelor de împerechere, în care se transferă plasmide. Mecanismul transferului plasmidelor nu se cunoaşte. După dobândirea plasmidei, celula receptoare încetează prompt sinteza feromonilor.

Conjugarea mediată de transpozoni

Transpozonii conjugativi se găsesc predominant la bacteriile Gram pozitive (*E. faecalis*), dar apar şi la bacteriile Gram negative. Transpozonii sunt prea mici pentru a codifica numeroasele proteine *Tra*. Ei se transferă de la o celulă la alta, probabil, sub forma unei molecule dublu catenare, închisă covalent. Transferul conjugativ al lui Tn_{925} este mai bine cunoscut. Tn_{925} are proprietatea de a mobiliza genele cromosomale şi plasmidele neconjugative. Cuplul de celule conjugate se aseamănă cu protoplaştii care fuzionează, ceea ce permite un schimb genetic extensiv. Canalul de transfer în conjugarea mediată de transpozoni are dimensiuni variate. Un canal larg permite un schimb masiv de material genetic, iar unul strâmt, limitează schimbul.

Transferul ADN-T de la *A. tumefaciens* în celulele vegetale are particularităţi speciale, rezultatul fiind *tumorigeneza*. Transferul ADN-T este singurul exemplu de schimb de material genetic între microorganisme şi celulele eucariote. ADN-T trebuie transferat prin membranele internă şi externă ale celulei bacteriene şi prin membrana citoplasmatică a celulei vegetale, iar în final, intrarea în nucleu.

ADN-T este transferat printr-un canal membranar edificat de proteinele codificate de genele bacteriene *vir*, care se activează sub acţiunea compuşilor fenolici (de exemplu, acetosiringon), eliberaţi de celulele lezate ale plantei.

ADN-T este o copie lineară a unei părţi a plasmidei Ti, delimitată la extremităţi de secvenţe repetate direct. ADN-T este transferat sub forma unei molecule de ADN monocatenar, complexată cu proteine *Vir*. Analiza ADN în celulele bacteriene, după activarea genelor *vir*, a evidenţiat ADN dublu catenar circular şi linear, dar şi ADN monocatenar linear.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sexducţia

Transferul genelor cromosomale bacteriene, mediat de plasmidele de sex, este numit *sexducţie* sau *transducţie mediată de plasmidele de sex.* Cel mai studiat mecanism de sexducţie este cel mediat de plasmida F, sau F-ducţia.

La unele tulpini Hfr de *E. coli*, factorul F are tendinţa de trecere în stare autonomă, prin fenomenul de excizie din structura cromosomului. Excizia este controlată de secvenţele de inserţie. Wollman (1956) a presupus posibilitatea exciziei plasmidelor F, împreună cu gene cromosomale adiacente, iar Jacob şi Adelberg (1956) au izolat plasmida *F-lac* (purtătoare a operonului lac), ce se poate transfera celulelor lac^-.

Plasmida F, excizată incorect din situsurile sale de inserţie, purtătoare de gene cromosomale se numeşte plasmidă F'.

Excizia plasmidei F are loc după modelul exciziei fagilor care fac transducţie specializată. Fenomenul exciziei are loc la două situsuri:

- când unul este situat pe cromosom şi cel de al II-lea la punctul de inserţie a plasmidei F, rezultă plasmida F'I. Plasmida excizată poartă gene cromosomale la o singură extremitate. Cromosomul bacterian suferă deleţie pentru genele excizate;
- când cele două situsuri de excizie sunt situate pe cromosom, de o parte şi de alta a factorului F, se formează plasmidă F'II. Plasmida excizată poartă gene cromosomale la ambele extremităţi. Genele excizate odată cu plasmida, sunt păstrate şi în cromosom, printr-un proces de recombinare reciprocă, astfel ca plasmidele F' conferă diploidie pentru secvenţa cromosomală încorporată.

Bacteriile F' au caracteristici comune, atât celulelor F^+ cât şi celulelor Hfr şi de aici derivă denumirea lor de "masculi" intermediari.

În procesul conjugării dintre o celula F' şi alta F^-, celula receptoare dobândeşte întreaga plasmidă F' şi devine celulă mascul, diploidă pentru genele transferate de plasmidă F'. Genele cromosomale din plasmidele F' se recombină cu regiunile cromosomale omologe şi rezultă recombinanţi, care poartă două copii ale genelor transduse de plasmidă F': un set de gene plasmidiale şi altul localizat pe cromosom.

Transducţia genetică

Transducţia este procesul de transfer al materialului genetic între celulele bacteriene, mediat de bacteriofagi. Zinder şi Lederberg (1952) au descoperit transducţia generalizată *la Salmonella typhimurium.* Ei au pus în contact mutante *auxotrofe*, cu diferite incapacităţi de sinteză şi ulterior, au izolat, pe un mediu minimal, colonii recombinante *prototrofe.* Pentru a-l deosebi de conjugare, ei au demonstrat că acest proces genetic nu necesită contactul fizic dintre celula donoare şi cea receptoare de material genetic. Agentul mediator al transferului genic, trece prin porii filtrului, suficient de mici pentru a opri bacteriile. Procesul nu s-a datorat nici transformării genetice, deoarece este rezistent la DN-ază. Vectorul purtător de gene, de la celula donoare la cea receptoare a fost fagul temperat P_{22}. Profagul P_{22} a fost indus spontan şi astfel celulele lizogene au evoluat spre liză. S-au asamblat particule virale transductoare, care au infectat celulele celei de a II-a tulpini de *Salmonella* din amestecul celular. Particulele virale erau purtătoare ale genei bacteriene de tip sălbatic, care s-a recombinat cu cromosomul celulelor mutante (auxotrofe), rezultând astfel celule prototrofe, care cresc şi se divid pe mediul minimal şi formează colonii.

În raport cu diversitatea genelor transduse şi cu gradul de manifestare a efectului transducţiei asupra celulelor descendente, se descriu trei variante ale procesului;

- transducţie specializată;
- transducţie generalizată;
- transducţie abortivă.

Transducţia specializată a fost descoperită de Lederberg (1953). Este caracteristică fagului lambda, ca o consecinţă a faptului că genomul său se integrează riguros, numai între genele *gal* şi *bio* ale cromosomului de *E. coli*, în raport cu care prezintă omologie genetică. Integrarea este rezultatul recombinării genetice la situsuri specifice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

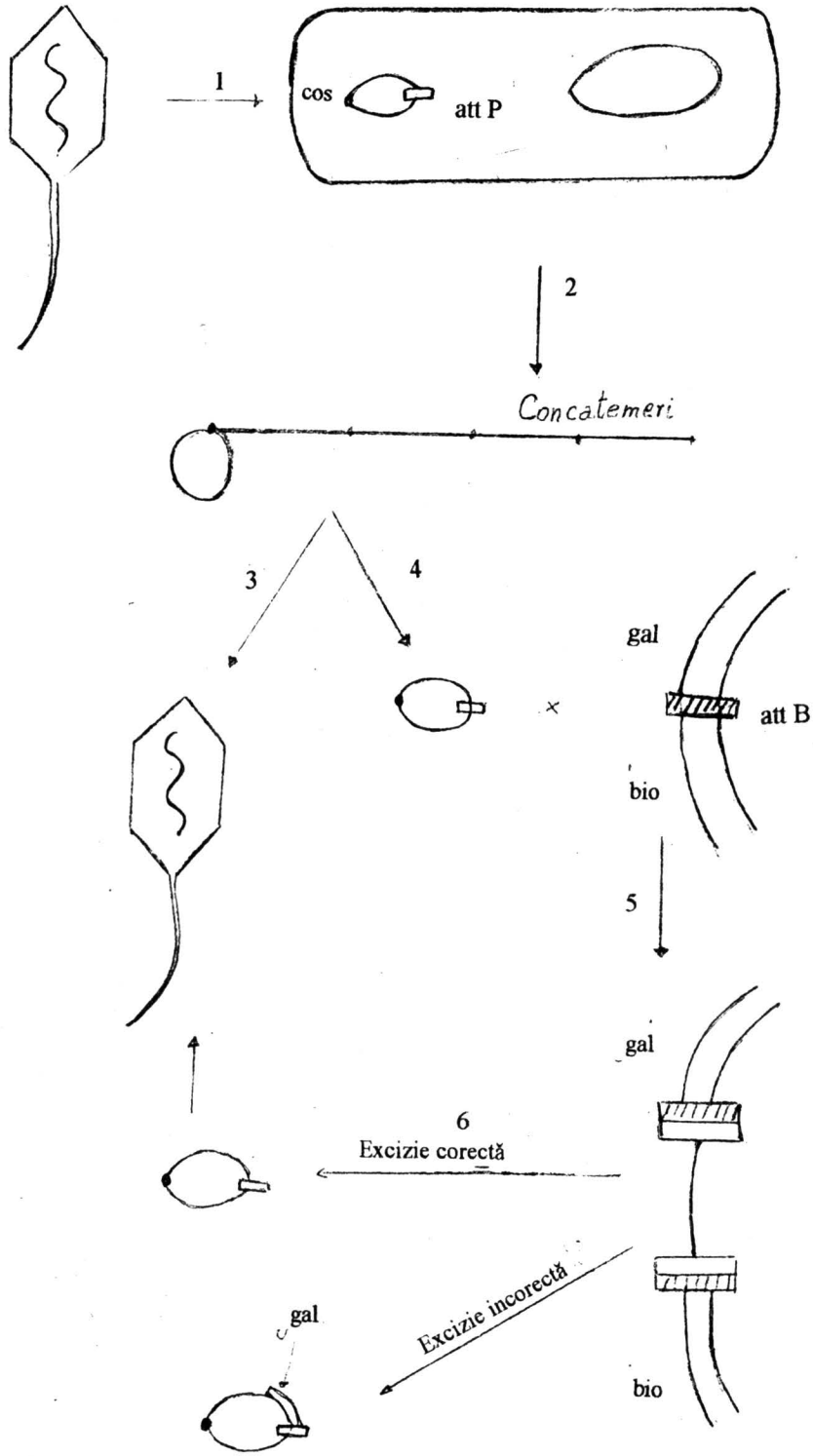


Fig. 226. Ilustrarea schematică a procesului de transducţie genetică. După ce fagul λ infectează o celula de *E. coli*, genomul său se circularizează şi cuplul evoluează în două direcţii alternative: 1) evoluţia litică, în cursul căreia cromosomul se replică şi formează concatemeri ce vor fi clivaţi şi împachetaţi în particulele fagice progene; 2) evoluţia lizogenă, în cursul căreia fagul se integrează în cromosomul celulei, prin recombinare la situs specific. Sub acţiunea unui factor inductor, genomul fagic se excizează printr-un proces invers celui de integrare. În situaţii rare, procesul de excizie este aberant (incorect), adică genomul fagic încorporează secvenţe cromosomale ale celulei gazdă, dar pierde o secvenţă de mărime echivalentă. Dacă genele fagice nu sunt esenţiale pentru ciclul de multiplicare, cromosomul fagic recombinat se replică şi se asamblează fagi progeni transductori.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În stare integrată, profagul se comportă ca orice genă cromosomală, adică se replică sincron cu cromosomul şi este transmis tuturor celulelor descendente.

Sub acţiunea unor factori fizici (şocuri termice, radiaţii UV etc.) sau chimici, genomul viral este excizat din inserţiile sale cromosomale, se circularizează şi se replică productiv, generând fagi progeni. Procesul se numeşte *inducţie litică*, deoarece rezultatul este liza celulei bacteriene. Inducţia litică este consecinţa anihilării acţiunii proteinei *represor*, singura codificată de genomul fage integrat. Excizia genomului fagic are loc sub acţiunea unor enzime şi de regulă, secţionarea se face la situsurile *cos* care flanchează genomul fagic, ceea ce corespunde unei excizii corecte. Proteina *Rec A* se activează şi devine *protează*, substratul acţiunii sale fiind represorul codificat de fagul λ, iar *excizionaza* (o endonuclează) secţionează genomul fagic. Excizionaza formează un complex funcţional cu integraza, ce se leagă strâns de situsul POB'. Acţiunea lor combinată determină excizia profagului.

Cu o frecvenţă mică (1/10^6 celule), excizia genomului fagic este incorectă. Astfel, se excizează un genom fagic care poartă gene bacteriene, dar căruia îi lipseşte o secvenţă echivalentă de nucleotide virale, la extremitatea opusă. Genomul viral modificat, se replică, este tradus la proteine virale şi se asamblează fagi transductori.

Fagul λ este excizat împreună cu gena cromosomală *gal, bio*, ori cu ambele. Datorită integrării genelor bacteriene în cromosomul fagic, are loc pierderea (prin recombinare) unei secvenţe echivalente ca mărime, din genomul fagic. Rezultă astfel, *fagi transductori defectivi*, deoarece cantitatea de material genetic ce poate fi împachetată în capul fagului este constantă. ADN viral este pierdut totdeauna la extremitatea opusă genelor bacteriene dobândite de fagul transductor. Foarte rar pot fi generaţi fagi transductori, care conţin genomul viral complet, împreună cu secvenţe de ADN bacterian, derivate de la ambele extremităţi ale punctelor de inserţie a profagului.

În general, fagii transductori sunt defectivi şi în consecinţă, incapabili să se multiplice şi să lizeze celula bacteriană. De aceea, pentru a iniţia ciclul de multiplicare şi liza celulei bacteriene, necesită prezenţa fagilor helper.

În celula infectată, de cele mai multe ori, genomul fagului transductor este supus acţiunii enzimelor de restricţie şi este degradat.

Cu o frecvenţă mică, genomul fagului transductor se poate integra în cromosomul bacterian, printr-un proces de recombinare şi genele transduse pot conferi noi caractere fenotipice celulei bacteriene. De exemplu, fagul transductor defectiv λ *dgal*$^+$, după ce infectează şi genomul său se recombină cu cromosomul unei bacterii defective pentru utilizarea galactozei (gal$^-$), îi conferă acesteia capacitatea de a metaboliza galactoza. Celula bacteriană care a dobândit un fenotip nou se numeşte *transductant*. Fragmentul de material genetic transdus de genomul fagic este adăugat genomului bacterian, şi nu substituit.

Transducţia fagică este un proces care se realizează cu o frecvenţă mică, dar datorită numărului mare de particule virale şi a celulelor bacteriene infectate, această modalitate de transfer de material genetic între celulele bacteriene, are rol semnificativ în condiţii naturale.

Transducţia generalizată, nelimitată sau nerestrictivă este procesul de transfer, prin intermediul unui fag, a oricărei gene a cromosomului bacterian, indiferent de poziţia sa în genom. Procesul a fost descris pentru fagul P_1 care infectează *E. coli*, pentru fagul P_{22} la *Salmonella* şi pentru unii fagi care infectează celulele de *B. subtilis*.

Fagii de transducţie generalizată au proprietatea, ca în ciclul litic în raport cu celula bacteriană, să încorporeze fragmente cromosomale ale gazdei.

Virusul P_1 are ca genom o moleculă de ADN lineară, dublu catenară şi o capsidă icozaedrică. ADN, de 100 kb este permutat ciclic şi are secvenţe repetitive terminale. Ca şi genomul fagului T_4, după infecţie, molecula se circularizează.

Cuplul poate urma ciclul litic sau lizogenic. Varianta lizogenă necesită replicarea ADN circular, în stare fizic autonomă. In stare lizogenă, fagul P_1, sub forma moleculei circulare este menţinut într-un număr minim de copii (una/celulă), datorită unui control stringent al replicării, ca şi în cazul plasmidei F. Mecanismul distribuţiei poate deveni ineficient dacă un proces de recombinare omologă a creat o molecula dimerică, ce se distribuie numai în una din cele două celule fiice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În evoluţia litică, ADN fagic se replică după modelul *theta* şi al *cercului rotativ*. Rareori, în procesul asamblării, sunt încorporate şi fragmente de ADN ale cromosomului bacterian, rezultând fagi de transducţie generalizată.

Infecţia celulelor de *Salmonella* cu fagul P_{22} produce fragmentarea ADN celular. În cursul morfogenezei virale, în capside se împachetează uneori, exclusiv ADN bacterian şi rezultă fagi transductori. În capsidele goale sunt încorporate, de regulă, numai gene de provenienţă bacteriană şi numai în mod excepţional sunt încorporate gene celulare în asociaţie cu mici fragmente de genom viral. Teoretic, oricare dintre genele cromosomale, are o şansă egală de a fi transdusă (de aceea se numeşte transducţie generalizată), deşi, practic, unii cistroni sunt transduşi cu o frecvenţă mai mare. In capsida fagică sunt împachetate preferenţial, fragmentele de ADN care au o secvenţă similară secvenţei "pac" (*packing* = împachetare), care reglează împachetarea genomului fagic. Aparatul enzimatic de împachetare a genomului fagic recunoaşte secvenţa anologă şi astfel fragmentele de ADN bacterian sunt încorporate în capsida virală. Rezultă astfel, particule fagice care poartă diferite fragmente ale cromosomului bacterian. Deşi în celulă există cantităţi aproximativ egale de ADN fagic şi ADN celular, numai un mic procent al fragmentelor cromosomului bacterian este împachetat şi un procent mic de particule virale sunt transductoare. Factorul limitant al asamblării fagilor transductori este frecvenţa secvenţelor *pac*.

Particulele fagice care încorporează exclusiv sau preponderent gene bacteriene sunt totdeauna *defective*. Aceşti fagi nu sunt obligatoriu lizogenizanţi. După ce infectează o nouă celulă bacteriană, nu se multiplică şi nu au efect litic, deoarece lipsesc genele virale esenţiale. Genele transduse pot fi integrate prin procese de recombinare, în cromosomul bacterian. Procesul se realizează prin înlocuirea unor determinanţi genetici ai celulei receptoare, cu cei transduşi. Recombinarea necesită omologie genetică între secvenţele de ADN participante şi este dependentă de proteina *Rec A*.

Transducţia abortivă (incompletă) se caracterizează prin faptul că genomul virusului transductor nu determină liza, dar nici nu se integrează în cromosomul celulei infectate.

Recombinarea fragmentelor de ADN transduse, de origine bacteriană, are loc cu o frecvenţă foarte mică. Majoritatea fragmentelor transduse rămân în citoplasma celulelor receptoare. Nu se replică, deoarece nu conţin o origine a replicării şi astfel sunt moştenite numai de una din cele două celule surori care rezultă la fiecare diviziune. Totuşi, sunt gene funcţionale şi codifică produsul lor în celula receptoare, în care determină o stare de diploidie parţială. Genele transduse se diluează treptat în populaţia celulară, prin diviziune.

Dacă celula este mutantă nutriţională (datorită mutaţiei unei gene cromosomale), iar fragmentul transdus îşi are originea într-o celulă prototrofă, se produce complementarea genică şi reversia la prototrofie a celulei receptoare. La fiecare diviziune celulară, produsul de sinteză a genei transduse poate fi distribuit în cele două celule surori şi astfel, celula care nu primeşte fragmentul de ADN, fenotipic poate rămâne de tip sălbatic, până când produsul este degradat sau diluat prin diviziuni succesive. Astfel de celule produc colonii mici, spre deosebire de transductanţii stabili, care produc colonii de dimensiuni normale.

Un alt exemplu al transducţiei abortive este acela al genelor care determină sinteza şi asamblarea flagelului. In acest caz, merodiploidul format prin transducţia abortivă este mobil, iar celula soră rezultată prin diviziune, este imobilă. Pe o placă cu agar moale, merodiploidul este mobil, iar celulele imobile formează o colonie tipică.

Transducţia plasmidelor

Aşa cum cromosomul bacterian poate fi împachetat în fagii de transducţie generalizată, în mod asemănător ADN plasmidial poate fi înglobat în capsidele virale. Dacă plasmida este mai mare decât capul fagic, se împachetează numai o parte a plasmidei. Plasmida R este mai mare decât capul fagului P_{22}. Fragmentul de plasmidă transdus nu se poate circulariza (nu are secvenţe omologe de baze) şi nici nu se poate integra în cromosomul gazdei şi de aceea va fi degradat. Plasmidele prea mici nu produc un cap fagic stabil, dar formele lor multimere pot fi împachetate eficient.

Transducţia este un proces care are loc şi la bacteriile Gram pozitive: *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* şi *B. subtilis*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Conversia fagică

Conversia fagică este procesul apariţiei unor proprietăţi fenotipice noi ale celulei bacteriene, consecutiv intrării în acţiune a unor *gene fagice*. Fenomenul conversiei fagice se manifestă la unele bacterii infectate cu un fag temperat netransductor, care persistă în celulă, fie în stare de *profag* (integrat în cromosomul bacterian), fie în stare *fizic autonomă*.

Conversia fagică se deosebeşte de transducţia fagică specializată, prin două particularităţi esenţiale:

- modificările celulei bacteriene sunt rezultatul expresiei unor gene de origine virală (şi nu bacteriană, ca în cazul transducţiei fagice;

- fagii care realizează fenomenul de conversie sunt normali şi posedă tot setul de gene, în timp ce fagii de transducţie specializată sunt defectivi, datorită pierderii unor gene proprii, prin înlocuirea lor cu gene ale cromosomului bacterian.

Fenomenul conversiei fagice este cunoscut la *Corynebacterium diphteriae*. Celulele care au ca material genetic numai propriul cromosom, nu sunt virulente şi nu determină un proces patologic infecţios. Apariţia virulenţei este condiţionată de infecţia cu fagul *beta*, al cărui genom se integrează în cromosomul bacterian. Sinteza toxinei difterice este codificată de o genă fagică.

Un alt exemplu este acela al structurii chimice a lipopolizaharidului din peretele celular de *Salmonella*. S-a descris fenomenul de conversie serologică a unei linii de *S. anatum*, după infecţia cu un fag, ca o reflectare a modificării compoziţiei chimice a polizaharidului din molecula de lipopolizaharid. După pierderea profagului prin excizie, liniile bacteriene respective revin la fenotipul anterior infectiei fagice: *C. diphteriae* pierde capacitatea de a sintetiza toxina (îşi pierde patogenitatea), iar *S. anatum* revine la tipul serologic iniţial. Se consideră că aceste gene fagice, la origine au fost gene cromosomale, dar au fost încorporate şi au devenit gene fagice.

Transfecţia

Transfecţia este o variantă a transformării genetice, prin intermediul acizilor nucleici de origine virală. In acest scop se poate folosi atât ADN cât şi ARN.

Transfecţia a fost definită de Foldes şi Trautner (1964). Ei au tratat suspensia de celule bacteriene cu ADN fagic purificat. După cultivarea celulelor pe suprafaţa plăcilor cu mediu solidificat, au observat apariţia plajelor de liză, al căror număr este proporţional cu cantitatea de ADN adăugat suspensiei celulare.

Transfecţia a fost realizată, în special, la bacterii Gram negative: *E. coli, A. tumefaciens, E. aerogenes, P. aeruginosa, S. typhimurium,* dar şi la *B. subtilis.*

La *E. coli*, transfecţia a fost descrisă de Kaiser şi Hogness (1960), ca rezultat al interacţiunii dintre ADN purificat al fagului λ transductor (λ *dgal*), cu celulele lizogenizate de fagul λ. Transfecţia este uşurată dacă celulele sunt infectate simultan cu un fag helper netransductor. Fagul helper asigură perforarea peretelui celular şi probabil că pe măsură ce fagul injectează propriul sau ADN, situsul *cos* al ADN de transfecţie se asociază cu ADN al fagului helper şi astfel moleculele sunt transportate simultan în celulă.

Deoarece fagii transductori conţin gene cromosomale bacteriene, transfecţia realizează concomitent şi procesul transformării genetice.

La *E. coli*, transfecţia, similar transformării, se poate realiza după tratarea celulelor cu o soluţie de Ca^{2+} 0,025 M, care asigură o permeabilizare a învelişurilor celulare faţă de ADN de diferite proveniente.

Proporţia celulelor care încorporează ADN fagic creşte semnificativ după tratamentul cu lizozim şi EDTA, în urma căruia rezultă sferoplaşti.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

REGLAREA ACTIVITĂŢII CELULEI BACTERIENE

Activitatea metabolică a celulei bacteriene se adaptează permanent condiţiilor de mediu mereu schimbătoare, prin intermediul unor mecanisme fine şi eficiente.

Simplitatea organizării interne a celulei bacteriene şi deosebita sa plasticitate fiziologică îi asigură supravieţuirea în contextul unor variaţii largi ale condiţiilor de mediu, spre deosebire de celulele organismelor superioare, care tolerează modificări în limite foarte restrânse ale parametrilor homeostaziei. Celula bacteriană se găseşte într-o permanentă stare de echilibru dinamic, în care toate componentele sale structurale sunt continuu construite şi degradate.

Bacteriile sintetizează unele enzime necesare degradării anumitor substraturi, numai când aceştia sau analogii lor se găsesc în mediu.

În mod obişnuit, bacteriile necesită produsele de sinteză ale unui singur operon. În celulă funcţionează mecanisme reglatoare de tip on-off care permit sinteza enzimelor, numai dacă acestea sunt cerute de condiţiile externe.

Selecţia naturală optimizează eficienţa. Sistemele reglatoare ale celulelor procariote au o finalitate teleonomică precisă: să favorizeze creşterea cu o rată maximă, cu excepţia cazurilor în care creşterea ar fi dăunătoare. Aceiaşi strategie a finalităţii se aplică şi organismelor eucariote unicelulare: levuri, alge, protozoare.

Reglarea celulară la bacterii este supusă unor reguli generale:

1) moleculele care sunt necesare numai ocazional, se sintetizează numai când prezenţa lor este necesară;

2) o activitate enzimatică ce consumă inutil energie, sau consumă o moleculă care este substratul unei alte enzime, este de obicei inhibată;

3) dacă celula are mai multe căi metabolice disponibile, ea va alege calea care produce o cantitate mai mare de energie pe unitatea de timp.

Schimbările chimice în lumea vie se produc pe cale metabolică, adică printr-o secvenţă de reacţii, fiecare fiind catalizată de o enzimă specifică.

La bacterii, reglarea activităţii unei astfel de căi, se face prin sinteza sau inhibiţia sintezei întregului set de enzime şi proteine accesorii: ori se sintetizează întregul set de enzime, ori nu se sintetizează nici una. Acest fenomen, denumit *reglare coordonată* derivă din controlul sintezei unei molecule de ARNm policistronic, care codifică toate produsele genice.

Un operon funcţionează când este necesar (*on*) şi se întrerupe (*off*) când enzimele codificate sunt inutile pentru celulă.

După Kleinsmith (1976), activitatea mecanismelor reglatoare se poate desfăşura la 4 nivele:

- la nivelul transcrierii genetice (prin sinteza ARN sau prin blocarea ei);
- prin controlul la nivelul traducerii genetice;
- prin modificarea directă a activităţii enzimelor existente în celulă;
- prin modificarea ratei degradării proteinelor.

Controlul la nivelul *traducerii* mesajului, este un eveniment mult mai rar, dar cele de reglare la nivelul *transcrierii* sunt comune.

Controlul la nivelul *transcrierii* prin oprirea procesului nu are semnificaţia blocării sale complete (off state). Nu se cunoaşte nici un sistem cu întrerupere totală a sintezei ARNm. Totdeauna rămâne un nivel foarte scăzut al transcrierii, ce constă din 1-2 evenimente de transcriere/generaţie celulară, astfel încât sinteza produsului genic este foarte limitată. Numai în sporii bacterieni, exprimarea genelor este total oprită.

Mecanismele de reglare la nivelul transcrierii sunt dependente de rolul enzimelor reglate: dacă acţionează în căile degradative sau au rol în reacţiile de anabolism. De exemplu, într-un sistem degradativ cu mai multe trepte, disponibilitatea moleculei ce urmează a fi degradată, condiţionează adeseori, sinteza enzimelor. Invers, într-o cale biosintetică, produsul final al căii, este adeseori, molecula reglatoare.

Chiar într-un sistem în care o singură moleculă proteică este sintetizată din ARNm monocistronic, proteina poate fi autoreglată, adică ea însăşi poate să inhibe iniţierea transcrierii. Concentraţia crescută a proteinei, scade rata transcrierii ARNm specific.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

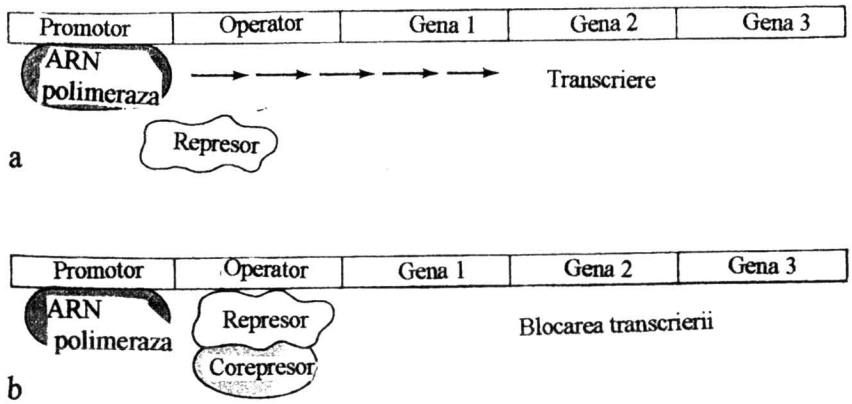


Fig. 227. Mecanismul represiei sintezei enzimelor. a. Represorul este inactiv, adică nu se poate asocia cu secvenţa operator, iar genele operonului sunt transcrise în ARNm. b. După legarea corepresorului (o moleculă mică exogenă) cu represorul, acesta se activează, se asociază la regiunea operatoare şi transcrierea genelor operonului este blocată (după Brock, 1988).

Mecanismele moleculare sunt proprii pentru fiecare sistem reglator, dar în funcţie de efectele asupra celulei, procesele reglatoare sunt de două categorii:

1) Procese reglatoare *pozitive* sunt acelea în care exprimarea informaţiei genetice creşte cantitativ. Intr-un sistem reglat pozitiv, o moleculă efectoare (o proteină, un complex molecular) activează rata transcrierii de la un promotor.

2) Procesele reglatoare *negative* semnifică diminuarea cantitativă a exprimării informaţiei genetice. Intr-un sistem reglat negativ, transcrierea genelor este blocată de un inhibitor prezent în celulă. Inhibitorul se numeşte *represor*. Pentru reluarea transcrierii, este necesar un antagonist al represorului denumit *inductor*.

O cale degradativă poate fi reglată pozitiv sau negativ.

Într-o cale biosintetică, produsul final al căii, reglează negativ propria sa sinteză.

Activitatea reglatoare a diferitelor activităţi celulare se realizează la nivelul unităţilor genetice denumite *operoni*.

Modelul reglator al operonului

Operonul este o unitate funcţională de reglare, alcătuită dintr-un grup de cistroni (A, B, C etc.), care codifică o anumită funcţie (de exemplu, biosinteza enzimelor unei căi metabolice) şi este transcrisă unitar într-o moleculă de ARNm policistronic. Cel mai cunoscut este operonul *lac*, care codifică şi reglează sinteza enzimelor ce intervin în metabolismul lactozei.

Pe baza studiului operonului *lac*, Jacob şi Monod (1967) au elaborat modelul clasic de structură a operonilor. Un operon este alcătuit din:

- *gene structurale;*
- regiunea *operator* (o) formată din circa 27 de perechi de baze, ce funcţionează ca situs de recunoaştere şi legare a represorului specific;
- regiunea *promotor* (p), cu o lungime de circa 80 de baze, cu rolul de a lega ARN-polimeraza pentru iniţierea transcrierii genelor structurale;
- *gena reglatoare*, situată adiacent sau la distanţă de regiunea operatoare, ce ţine sub control toate celelate gene ale unui operon.

La bacterii, activitatea genică este reglată, în primul rând, la nivelul transcrierii. Transcrierea coordonată a genelor într-un operon este blocată de proteinele represor şi este activată de proteinele stimulatoare.

Elementele genetice ale operonului bacterian sunt următoarele: gena *reglatoare* (i), situsul *operator* şi un set de gene *structurale* (z, y, a).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

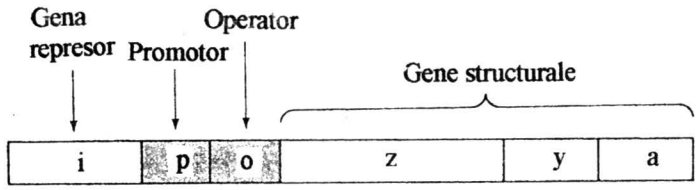


Fig. 228. Harta genetică a operonului *lac*. Secvenţele *p* şi *o* sunt mult mai mici decât genele.

Gena reglatoare (i) codifică sinteza unui represor de natura proteică, ce interacţionează cu situsul operator. Situsul operator este un segment de ADN adiacent genei structurale pe care o controlează. Operonul *lac* poate fi reglat pozitiv (inducţie) sau negativ (represie).

Reglarea pozitivă (Inducţia sintezei enzimelor)

Majoritatea genelor din structura cromosomului bacterian sunt nefuncţionale în absenţa substratului specific, astfel că enzimele de catabolism nu se sintetizează. După adăugarea substratului în mediu, gena (genele) se activează, fenomen cunoscut sub denumirea de *inducţie sau derepresie.*

Enzimele care se sintetizează numai în prezenţa substratului corespunzator (adăugat în mediul de creştere) se numesc enzime *inductibile sau adaptative* (Karstrom, 1938). Enzimele *constitutive* sunt acelea a căror sinteză este permanentă, independentă de prezenţa substratului în mediu.

Numeroase enzime de catabolism aparţin categoriei enzimelor inductibile. Cei mai cunoscuţi inductori sunt amidonul (pentru amilază), zaharoza (pentru invertază), lactoza (pentru beta-galactozidază).

Mecanismul molecular al inductiei enzimatice. E. coli utilizează lactoza ca unică sursă de carbon. Enzimele esenţiale pentru catabolismul acestui dizaharid sunt *beta-galactozidaza* (sub acţiunea căreia, lactoza este hidrolizată la galactoză şi glucoză), *galactozid-permeaza* (necesară transportului lactozei prin membrana celulei bacteriene) şi *thiogalactozid-transacetilaza* (al cărei rol fiziologic este incert).

Celulele de *E. coli* cultivate pe un mediu cu glucoză sau cu glicerol, conţin mai puţin de 10 molecule de beta-galactozidază/celulă, iar numărul lor creşte la câteva mii, după cultivarea celulelor pe mediul cu lactoză. Sinteza beta-galactozidazei este inductibilă.

Inductorul fiziologic al sintezei beta-galactozidazei este alolactoza (izomerul glucoză-1,6-galactoză), derivată din lactoză, printr-o reacţie de transglicozilare. Sinteza alolactozei este catalizată de cele câteva molecule de beta-galactozidază, existente în celulă, înainte de inducţie. Sinteza beta-galactozidazei la nivel minim se numeşte *sinteza constitutivă de bază* (bazală) şi este posibilă, deoarece legarea represorului de operator nu este niciodată atât de fermă încât să blocheze complet transcrierea operonului.

Inductorul (lactoza) se asociază cu represorul şi îl modifică, astfel încât acesta nu mai interacţionează cu operatorul. In prezenţa inductorului, operatorul rămâne liber şi promotorul este disponibil pentru iniţierea sintezei ARNm. Genele structurale *z, y, a* sunt transcrise într-o moleculă de ARNm, codificatoare pentru toate cele trei proteine. O moleculă de ARNm ce codifică sinteza a cel puţin două proteine diferite se numeşte poligenomică sau *policistronică.*

Reglarea operonului necesită ca gena operatoare sa fie adiacentă genelor structurale ale operonului (*lac z, lac y, lac a*), dar proximitatea genei *lac i* nu este obligatoriu necesară, deoarece represorul *lac I* este o proteină difuzibilă.

Genele ARNm lac sunt traduse diferenţial. Raportul cantitativ al celor trei proteine (beta-galactozidaza, permeaza şi transacetilaza) este 1,0 : 0,5 : 0,2. Sinteza lor diferenţiată cantitativ este rezultatul reglării traducerii pe două căi:

1) *Gena z* este tradusă prima, din ARNm policistronic. După sinteza beta-galactozidazei, jumatate din ribosomi se detaşează de molecula de ARNm. Cealaltă jumatate a numărului de ribosomi continuă traducerea şi la nivelul *genei y.* Astfel, numărul moleculelor de permează va fi numai jumatate din numărul moleculelor de beta-galactozidază;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

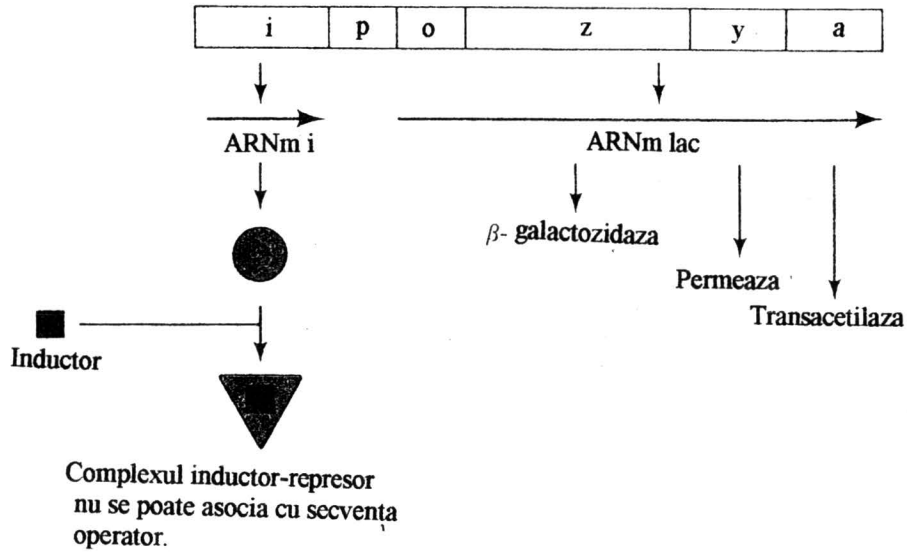


Fig. 229. Diagrama operonului *lac* în stare activă (indusă). Un inductor exogen se asociază cu represorul şi formează un complex inactiv, care nu recunoaşte secvenţa operator. Genele operonului sunt transcrise şi se sintetizează enzimele pentru catabolismul lactozei.

2) ARNm bacterian este degradat după câteva cicluri de traducere. Degradarea este lentă, dar începe cu o frecvenţă mai mare la nivelul *genei a* decât la nivelul *genei y*, iar degradarea la nivelul *genei y* este mai frecventă decât la nivelul *genei z*.

Reglarea negativă a operonului ***lac***

Proteina *represor* – produsul de sinteză a genei *lac I,* se leagă de secvenţa operatoare a operonului. Represorul s-a purificat din celulele bacteriene infectate cu fagi transductori ai genei *lac*. În absenţa inductorului, represorul se leagă cu mare afinitate de regiunea operatoare. Represorul găseşte situsul operator prin difuzie unidimensională de-a lungul moleculei de ADN şi nu prin difuzie din mediul citoplasmatic. Într-un mod asemănător îşi găseşte situsul promotor, molecula de ARN-polimerază. Represorul *lac* se leagă de situsul său cromosomal, cu un mare grad de selectivitate.

S-au izolat mutante defective pentru sinteza uneia din cele trei proteine. De exemplu, mutanta $z^-y^+a^+$ este defectivă pentru sinteza beta-galactozidazei, dar sintetizează permeaza şi transacetilaza. Cea mai interesantă clasă de mutante este aceea a mutantelor *constitutive*, care sintetizează cantităţi mari ale celor trei proteine în absenţa inductorului.

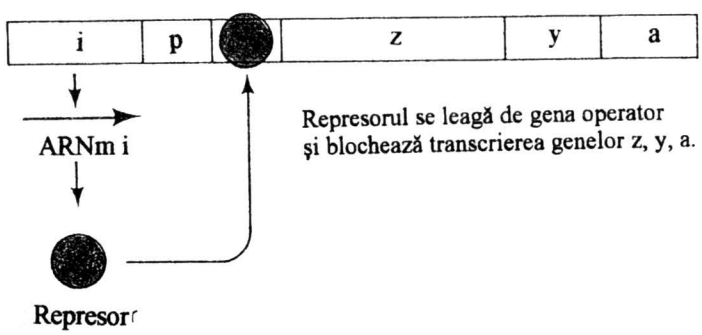


Fig. 230. Diagrama operonului *lac* în stare represată. Represorul activ se leagă de regiunea operator şi blochează transcrierea genelor structurale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Rata sintezei celor trei proteine este, în mod normal, controlată de o genă reglatoare comună (gena i). Bacteriile de tip sălbatic sunt inductibile şi au genotip i^+ z^+ y^+ a^+. Efectul reglator al genei *i*, se realizează prin intermediul represorului pe care-l codifică.

Represia sintezei enzimelor într-un sistem biosintetic. Operonul triptofanului

Represia enzimatică reprezintă fenomenul scăderii ratei de sinteză a unui grup de enzime metabolic înrudite, ori chiar de oprire a sintezei lor, ca urmare a prezenţei în celulă, a unui metabolit cu rol de represor. Enzimele din această categorie se numesc *represibile.*

Represia sintezei enzimelor s-a studiat la *E. coli.* Pe un mediu minimal, cu glucoză şi azot combinat anorganic, celulele sintetizează toţi monomerii necesari în proporţii optime. In medii complexe (cu aminoacizi), prezenţa produsului final al unei căi de biosinteză, reprezintă un semnal pentru celulă, care, printr-un fenomen de *feed-back negativ* sau de represie prin produsul final al căii, stopează biosinteza enzimelor devenite inutile, întrucât celula foloseşte cu precădere metabolitul existent ca atare în mediu. Invers, când aprovizionarea cu triptofan diminuă, se sintetizează enzimele sale de biosinteză.

Operonul triptofanului (trp) la *E. coli* codifică sinteza acestui aminoacid. Reglarea operonului se face astfel încât, când triptofanul se găseşte în mediul de creştere, operonul *trp* nu este transcris. Când aprovizionarea celulelor cu triptofan este insuficientă, transcrierea operonului este iniţiată.

Pentru reglarea uni căi biosintetice, o reglare de tipul *on-off* nu răspunde necesităţilor celulei. Este necesară o *reglare cantitativă,* deoarece în natură apar situaţii în care, o cantitate suboptimală de triptofan este disponibilă, dar aceasta este insuficientă pentru creşterea normală a celulei. Deficitul de triptofan în celulă, este evitat printr-un sistem reglator modulator, în care, nivelul transcrierii operonului în starea derepresată este determinat de concentraţia triptofanului disponibil. Acest mecanism reglator este activ pentru mulţi operoni care codifică biosinteza aminoacizilor.

Triptofanul se sintetizează în 5 trepte, fiecare catalizată de o enzimă specifică. La *E. coli,* genele codificatoare (*A, B, C, D, E*) ale enzimelor sunt traduse dintr-o moleculă de ARNm policistronic. Prima genă tradusă este *trp E.*

Gena reglatoare pentru sinteza represorului (*trp R*) este localizată departe de acest policistron. Proteina codificată de gena *trp R* este *aporepresorul trp,* inactiv ca atare, datorită lipsei totale de afinitate pentru regiunea operator. În prezenţa produsului final al căii de biosinteză (triptofanul), de origine exogenă sau acumulat prin sinteza endogenă, aporepresorul se activează: moleculele de triptofan, cu greutate moleculară mică, se comportă ca un *corepresor.* Complexul format din aporepresor şi corepresor se leagă de secvenţa operator şi transcrierea genelor *trp* este blocată.

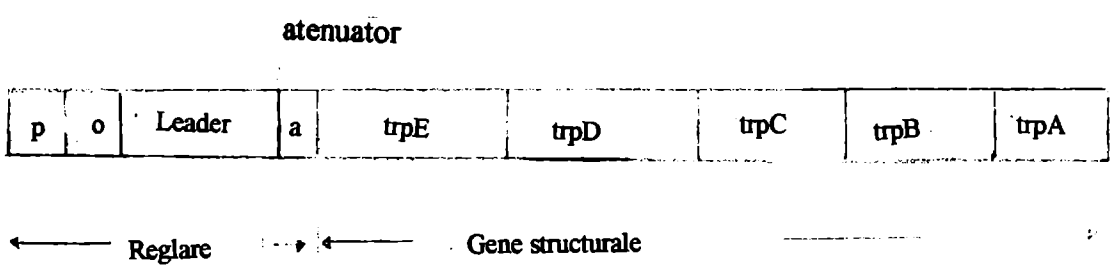


Fig. 231. Diagrama operonului triptofanului la *E. coli.*

Când aprovizionarea celulei cu triptofan exogen este diminuată, operatorul este liber şi transcrierea începe. Acesta este principiul mecanismului reglator on-off.

Căile biosintetice sunt controlate însă, prin mecanisme mai fine, în care concentraţia enzimelor unei căi este variabilă în funcţie de concentraţia produsului final al căii. Mecanismul constă în terminarea prematură a transcrierii, înainte ca prima genă structurală să fie transcrisă.

Pe măsură ce triptofanul disponibil scade, începe transcrierea, dar aceasta este modulată cantitativ. Între promotor şi operator sunt două regiuni, denumite *leader* şi *atenuator* (*trp L* şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

trp a). Secvenţa L, necodificatoare, se găseşte la capătul 5' al moleculei de ARNm. La bacteriile de tip sălbatic, în prezenţa triptofanului în mediu, transcrierea majorităţii moleculelor de ARNm se termină la secvenţa de 28 de baze, denumită *atenuator*. Rezultatul este transcrierea unui ARNm de 140 de nucleotide (al secvenţei *L*), fără ca genele structurale ale operonului sa fie transcrise. Secvenţa *Leader* codifică un polipeptid de 14 aminoacizi, care conţine triptofan în pozitiile 10 şi 11. Cei doi codoni ai triptofanului din secvenţa Leader sunt sensibili la concentraţia ARNt trp, adică, dacă aprovizionarea cu triptofan este suficientă, transcrierea dincolo de secvenţa Leader diminuă.

Moleculele de ARNm *Leader* au rolul de a recepţiona concentraţia triptofanului sintetizat de enzimele operonului. Dacă nivelul triptofanului este scăzut, ARN-polimeraza depăşeşte situsul atenuator şi transcrie întregul operon. Invers, creşterea concentraţiei aminoacidului în celulă, blochează transcrierea la nivelul secvenţei atenuator.

Alţi câţiva operoni care codifică sinteza aminoacizilor la *E. coli,* posedă situsuri atenuatoare şi realizează o reglare cantitativă asemănătoare. Secvenţa atenuatoare este senzor al concentraţiei celulare a aminoacidului a cărui sinteză o reglează. Peptidul *leader* al fiecărui operon conţine câţiva aminoacizi de tipul celor controlaţi de operon. De exemplu, operonul treoninei codifică enzime ce sintetizează treonina şi izoleucina. Peptidul *leader* conţine 8 resturi de treonină şi 4 resturi de izoleucină. În secvenţa *leader* de 15 aminoacizi a fenil-alaninei, se găsesc 7 resturi de fenil alanină, iar peptidul *leader* al operonului histidinei, conţine 7 resturi consecutive de histidină.

Din punct de vedere molecular, mecanismul reglator este condiţionat de faptul că la bacterii, transcrierea este cvasi-simultană cu traducerea mesajului.

Fenomenul represiei sintezei enzimelor prin *feed-back,* permite celulei să menţină în limite adecvate, concentraţiile relative ale enzimelor necesare sintezei aminoacizilor, proteinelor, acizilor nucleici etc.

Controlul activităţii enzimelor. Inhibiţia prin produsul final

Reglarea promptă a activităţii enzimatice pentru evitarea supraproducţiei de intermediari metabolici (aminoacizi, baze purinice şi pirimidnice), se realizează prin inhibiţia activităţii enzimelor, sub acţiunea produsului final de biosinteză. Acest proces reglator se numeşte *inhibiţie prin produs final, retroinhibiţie* sau *inhibiţie prin feed-back*.

Dacă celula ar controla numai biosinteza enzimelor, reglarea ar fi lipsită de promptitudine, deoarece enzimele deja existente în celulă, şi-ar exercita acţiunea catalitică şi rezultatul ar fi acumularea în exces a produsului căii respective. Celulele dispun de mecanisme de reglare fină, instantanee, ce constau în inhibarea sau blocarea funcţionării *primei enzime a căii biosintetice, sub acţiunea produsului final aflat în exces.*

Existenţa reglării prin inhibiţia activităţii enzimelor s-a demonstrat pentru mai multe sisteme enzimatice, în care biosinteza unor metaboliţi sau degradarea unui substrat se realizează printr-o serie de trepte succesive, fiecare fiind catalizată de o enzimă diferită. Grupul de enzime care acţionează cooperant pentru sinteza sau pentru degradarea unui metabolit se numeşte *zimom.* Prezenţa în mediu, a produsului final al ultimei trepte metabolice de sinteză, inhibă activitatea enzimei care catalizează prima treaptă a biosintezei şi astfel, întreaga serie de reacţii succesive este blocată, dar se reactivează în absenţa metabolitului.

E. coli sintetizează L-izoleucina din treonină. Dacă mediul minimal, cu glucoza şi NH_4^+ este suplimentat cu L-izoleucină, are loc blocarea promptă a activităţii enzimei L-treonin-deaminaza, implicată în prima treaptă a biosintezei. Astfel, enzimele care catalizează reacţiile următoare ale căii sintezei L-izoleucinei sunt lipsite de produşii intermediari, care reprezintă substratul lor specific.

De obicei este blocată numai prima treaptă a unui lanţ metabolic.

Mecanismul molecular al inhibiţiei prin produs final. Sitemele de retroinhibiţie sunt active, în esenţă, în reglarea căilor de biosinteză (anabolism). Produsul final al căii, inhibă acţiunea enzimei ce catalizează prima treaptă a sintezei produsului final. *Produsul final* al unei căi de biosinteză, formată din mai multe trepte, se deosebeşte net de *substratul* primei enzime.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Atât produsul final, cât şi substratul său nespecific, interacţionează cu aceiaşi enzimă. Aceste enzime au caracter de *proteine alosterice*. Interacţiunea cu substratul specific şi cu produsul final al căii, are loc la situsuri moleculare diferite. Când se combină cu produsul final al căii (efectorul alosteric), enzimele alosterice sunt incapabile să funcţioneze catalitic, deoarece situsul lor activ suferă o tranziţie alosterică, la forma inactivă. Astfel de proteine ale căror configuraţii spaţiale se modifică după legarea moleculelor mici specifice, la alte situsuri decât situsul activ, se numesc *proteine alosterice*, iar moleculele efectoare ale acestor transformări se numesc *efectori alosterici*.

Există mai multe tipuri de inhibiţie prin produs final:

- inhibiţia căilor multifuncţionale (multivalente), corespunde reglării căilor metabolice ramificate, în care se sintetizează mai mulţi produşi finali. Pentru a asigura inhibiţia reglatoare, este indispensabilă prezenţa diferiţilor produşi finali. Acţiunea izolată a fiecărui produs este ineficientă;
- inhibiţia cumulativă se caracterizează prin faptul că, fiecare din produsele finale ale unei căi ramifcate, chiar la concentraţia de saturare, inhibă parţial activitatea primei enzime. Diferiţii produşi finali acţionează sinergic;
- inhibiţia asupra izoenzimelor: enzima ce catalizează prima treaptă se găseşte sub mai multe forme (izoenzime), fiecare fiind sensibilă la acţiunea unui anumit produs. Cel mai cunoscut este cazul asparto-kinazei la *E. coli*, constituită din trei izoenzime.

Inhibiţia prin produs final este de ordin cantitativ. Produsul final inhibă parţial sau total, activitatea primei enzime, în funcţie de concentraţia sa în mediu. Inhibiţia totală a activităţii enzimei, se produce numai în cazul în care produsul final s-a acumulat în exces faţă de necesităţile celulei.

Aplicaţii ale represiei sintezei enzimelor în biotehnologie. Represia sintezei enzimelor oferă posibilitatea dirijării proceselor de biosinteză industrială, pe următoarele căi:

- limitarea prezenţei şi acumulării produşilor finali în mediu. Astfel, producerea glutamat-dehidrogenazei poate fi mărită de circa 20 de ori la *B. liqueniformis*, prin utilizarea glucozei sau malatului ca sursă de C, în loc de glutamat sau de hidrolizat de cazeină;
- limitarea producerii interne prin biosinteză, a produşilor finali, prin adăugarea în mediu, a unui inhibitor al căii metabolice;
- "înfometarea" parţială a unei mutante auxotrofe, faţă de produsul necesar creşterii;
- utilizarea unor mutante de reglare (mutante constitutive): fie a unor mutante care sintetizează un aporepresor ce nu se combină cu corepresorul, fie a unor mutante la nivelul regiunii operatoare, ce nu pot lega represorul. Ele sintetizează enzime constitutive, chiar în prezenţa unor concentraţii mari de produşi finali, care în mod normal sunt represoare.

Controlul sintezei proteice la nivelul traducerii

Genele codificatoare ale celor peste 50 de proteine ribosomale sunt localizate în peste 20 de operoni şi sinteza lor este controlată riguros. Controlul este esenţial, deoarece componentele ribosomale reprezintă peste 40% din greutatea uscată a celulei bacteriene.

Controlul sintezei proteinelor ribosomale se exercită în primul rând la nivelul *traducerii*, spre deosebire de alte proteine care sunt reglate la nivelul transcrierii.

Cel puţin o proteină, codificată de fiecare din cei peste 20 de operoni, are rolul de represor al traducerii. Represorul traducerii se leagă de ARNm lângă situsul de iniţiere a propriei sale sinteze şi blochează sinteza câtorva proteine codificate de mesajul poligenic.

Legarea proteinelor reglatoare, de ARNm, nu interferă cu asamblarea ribosomilor, deoarece proteinele ribosomale se leagă mai ferm de ÀRNr decât de ARNm.

Represia traducerii are loc numai când sinteza proteinelor ribosomale o devansează pe aceea a ARNr, sau când aceste proteine nu se formează în cantităţi echimolare.

Represia prin catabolit

Represia prin catabolit se exercită asupra sistemelor enzimatice inductibile ale catabolismului şi a fost descrisă sub denumirea de "efectul glucozei", deoarece, la unele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

microorganisme, glucoza reprezează catabolizarea altor glucide. Acest tip de represie este evident în condiţiile cultivării unor bacterii, într-un mediu ce conţine un amestec de zaharuri, care sunt catabolizate succesiv, astfel încât curba de creştere este de tip *diauxic*.

Fenomenul de diauxie este datorat represiei catabolice pe care o exercită un compus uşor şi rapid metabolizabil (glucoza), asupra utilizării unui alt glucid. Exemplul clasic al represiei prin catabolit, este al celulelor de *E. coli*, cultivate în prezenţa unui amestec de glucoză-lactoză. Cultura are o curbă de creştere diauxică. Dacă un microorganism se cultivă în prezenţa a două substraturi glucidice, din care unul este represor, iar sistemul enzimatic de catabolizare a celui de al II-lea este sensibil la represie, metabolizarea primului glucid blochează sinteza enzimelor de metabolizare a celui de al II-lea. *E. coli*, cultivată pe un mediu cu glucoză şi lactoză, creşte iniţial, exclusiv pe seama catabolizării glucozei, iar când concentraţia ei scade foarte mult, după o scurtă perioadă de lag, creşterea este reluată pe seama catabolizării lactozei.

Glucoza este metabolizată cu o rată superioară altor glucide, astfel încât, în celulă se acumulează o concentraţie suficientă de metaboliţi necesari diferitelor căi de sinteză.

Represia prin catabolit survine atunci când un compus este metabolizat atât de rapid, încât produşii intermediari acoperă întregul necesar de biosinteze ale celulei şi face inutilă şi chiar costisitoare, funcţionarea concomitentă a căii de degradare a altui compus. Cataboliţii intermediari în exces, represează nu numai enzimele căii metabolice prin care au fost generaţi, ci chiar şi enzimele oricărei alte căi care are potenţialitatea de a-i produce.

La nivel molecular, represia prin catabolit, este rezultatul scăderii concentraţiei de AMP ciclic. Legarea ARN-polimerazei pentru transcrierea operonului lac, are loc numai dacă o altă proteină, denumită *proteina activatoare a catabolismului* s-a asociat în imediata vecinătate a situsului promotor. Această proteină se asociază numai dacă, în prealabil, s-a activat în prezenţa AMP ciclic.

În prezenţa glucozei în mediu, nivelul AMP ciclic scade şi proteina activatoare a catabolismului nu se asociază promotorului operonului *lac*. In absenţa acesteia, ARN-polimeraza nu initiază transcrierea operonului. Astfel, represia prin catabolit pare a fi rezultatul unui deficit al AMP ciclic.

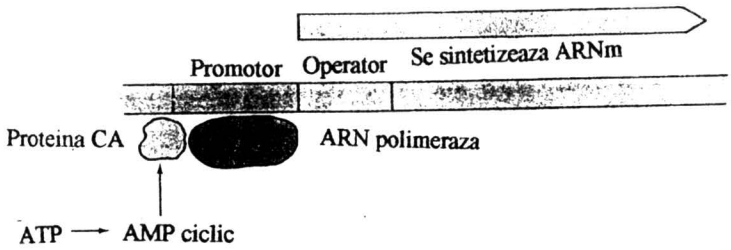


Fig. 232. Rolul AMP ciclic în sinteza ARNm şi mecanismul represiei catabolice. Când AMPc este disponbil, proteina activatoare a catabolismului (CAP) se asociază de un situs adiacent promotorului, care la rândul său stimulează legarea ARN-polimerazei. În prezenţa glucozei, AMPc este degradat, CAP nu se poate asocia şi ARNm nu este transcris (după Brock, 1988).

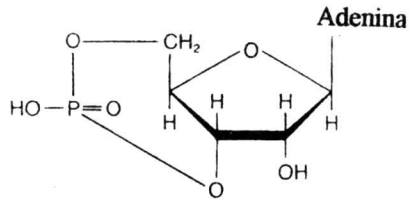


Fig. 233. Structura moleculară a AMP (Adenozin-monofosfatul) ciclic.

PRINCIPII DE INGINERIE GENETICĂ

Ingineria genetică (denumirea mai corectă este aceea de *inginerie genică*) are ca domeniu de activitate, modificarea structurii genetice a unui organism, prin introducerea unor gene noi, de la un organism al aceleiaşi specii, al unei specii diferite sau a unor gene artificiale. Ingineria genică oferă posibilitatea recombinării genelor provenite de la organisme îndepărtate filogenetic, care nu fac schimb de informaţie genetică pe cale naturală.

Ingineria genică este subordonată practicii *biotehnologice*, deoarece ea reprezintă numai prima etapă a procesului biotehnologic, etapa *reprogramării genetice*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Biotehnologia (Bioindustria) clasică a utilizat şi utilizează încă, microorganismele existente în mediile naturale şi este limitată la obţinerea produselor de fermentaţie: a berii, în vinificaţie, în industria panificaţiei.

Ulterior, în scopul optimizării randamentului productiv, s-au folosit *microorganisme selecţionate*. Astăzi, biotehnologia utilizează, pe scară tot mai largă, microorganisme reprogramate genetic. Scopul reprogramării genetice este ameliorarea proprietăţilor biologice ale microorganismelor de interes biotehnologic, precum şi conferirea unor proprietăţi noi de biosinteză.

Tehnicile de modificare a programului genetic al microorganismelor pot fi grupate în două categorii: de nivel *celular* şi de nivel *molecular*.

Ingineria genetică la nivel celular

În 1960, Barski a evidenţiat că celulele somatice ale organismului animal sunt capabile să fuzioneze şi să-şi reasorteze informaţia genetică. In 1965, G. Harris a remarcat că frecvenţa hibridării celulelor somatice creşte semnificativ, dacă în amestecul celular se adaugă particule de virus Sendai, inactivat cu radiaţii UV. Invelişul viral conţine o proteina de fuziune, care produce agregarea su fuziunea celulelor.

Pe calea fuziunii este posibilă hibridarea celulelor care provin de la organisme îndepărtate filogenetic: celule de şobolan şi şoarece, de şoarece şi om, celule normale şi tumorale etc.

Experienţele de fuziune s-au realizat iniţial la celulele vegetale. Ca şi celulele animale, protoplaştii celulelor vegetale pot să fuzioneze. Agentul favorizant al fuziunii este polietilenglicolul (PEG). Modelul vegetal al fuziunii se deosebeşte de cel animal, prin posibilitatea de principiu, de a clona planta întreagă, care întruneşte suma caracterelor celor doi parteneri care se hibridează prin fuziune. La unele specii de plante (tutun, morcov, viţă de vie, tomate), din protoplaştii fuzionaţi, după regenerarea peretelui celular şi formarea calusului, se poate regenera întregul aparat vegetativ al plantei.

Tehnica de inginerie genetică la nivel celular, aplicabilă microorganismelor se bazează pe *fuziunea protoplaştilor*.

Fuziunea protoplaştilor bacterieni

Utilizarea protoplaştilor în studiile genetice a întârziat, datorită aparentei incapacităţi a protoplaştilor celulelor Gram pozitive, de a reversa la condiţia de celulă cu perete.

Studiul lor a căpătat semnificaţii şi dimensiuni noi, după ce s-a observat că aceste structuri celulare nude au capacitatea să reverseze la forme celulare osmotic stabile, identice cu cele de origine. Această constatare a impulsionat cercetările de inginerie genetică celulară, al căror scop este obţinerea de noi tulpini de microorganisme de importanţă industrială, prin tehnica fuzionării protoplaştilor.

Agenţii de fuziune (PEG cu greutatea moleculară de 4 000-6000 D şi ionii de Ca^{2+}) măresc semnificativ capacitatea protoplaştilor de a se agrega, uneori în grupuri mari.

Scopul fuziunii este obţinerea celulelor cu determinanţi genetici noi, rezultaţi prin procesele de recombinare a genomurilor protoplaştilor parentali.

Pentru a urmări realizarea proceselor de recombinare se folosesc markeri genetici de morfologie, de auxotrofie, de rezistenţă la antibiotice etc.

Etapele metodologiei utilizării protoplaştilor

Fuziunea. In mediul de fuziune, care conţine PEG 50% şi ioni de Ca^{2+} (10–100 mM), în faza iniţială se produce aglutinarea protoplaştilor, datorită deshidratării intense, formându-se agregate de diferite dimensiuni. In zonele de contact strâns are loc o translocaţie a proteinelor membranare, urmată de interacţiuni lipidice între membranele adiacente. Moleculele fosfolipidice se reorganizează în zona de contact şi rezultatul este fuziunea intermembranară. Se stabilesc punţi citoplasmatice care cresc treptat, astfel încât fuziunea se definitivează.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru procesul fuziunii nu este în mod obligatoriu viabilitatea ambilor parteneri. Se poate realiza inactivarea prealabilă a uneia din cele două linii de protoplaşti fuzionanţi.

Cei doi parteneri participanţi la fuziune nu au polaritate. Ei sunt egali atât în capacitatea de a dona, cat şi de a primi informaţie genetică. Procesul de fuziune nu este limitat de bariere genetice sau de incompatibilitate.

Fuziunea protoplaştilor determină formarea unei noi entităţi, o celulă *binucleată*, care în decursul regenerării sau ulterior, *segregă* şi produce colonii care conţin celule cu genotip haploid, modificat prin recombinare.

Fuziunea s-a realizat la protoplaştii de *B. subtilis, B. megatherium, Streptomyces, E. coli*, precum şi la o serie de levuri şi fungi filamentoşi.

Regenerarea protoplaştilor semnifică refacerea peretelui celular şi reversia la structura celulară de origine. Regenerarea este o etapă esenţială şi este cea mai dificilă dintre etapele metodologiei utilizării lor. Regenerarea este rapidă şi totală, dacă protoplastul mai păstrează un rest din peretele vechi, care are rolul de primer pentru biosinteza noului perete.

Selecţia recombinanţilor se face după regenerarea pe un mediu special de reversie, un mediu selectiv pe care se pot dezvolta numai celulele revenite la prototrofie, prin procesul recombinării.

Aplicaţii practice ale fuziunii protoplaştilor. Fuziunea protoplaştilor este o tehnică de inginerie genetică la nivel celular, cu importanţă excepţională pentru biotehnologie, datorită aplicaţiilor potenţiale multiple. Fuziunea protoplaştilor este deosebit de importantă pentru microorganismele lipsite de mecanisme de transfer al informaţiei genetice, cărora le conferă în mod artificial, "sexualitate".

Metoda fuziunii protoplaştilor a fost aplicată bacteriilor din g. *Bacillus*, pentru obţinerea unor noi tulpini cu randament superior de producere a diferitelor enzime (proteaze, amilaze), din g. *Streptomyces*, pentru creşterea randamentului producţiei de antibiotice, precum şi a levurilor utilizate în producerea berii (*S. carlbergensis*).

Premisele ştiinţifice ale ingineriei genetice la nivel molecular

Ingineria genetică moleculară este un domeniu multidisciplinar, al cărui scop este dezvoltarea bioindustriei în general şi a microbiologiei industriale în particular. Evoluţia sa până la stadiul de corp unitar de metode şi tehnici proprii este rezultatul descoperirilor în domeniul biochimiei enzimelor şi acizilor nucleici de origine bacteriană. Progresele ştiinţifice ale microbiologiei din perioada 1950-1965, au avut un impact hotărâtor asupra dezvoltării biologiei în general, dar în special asupra dezvoltării conceptelor *biologiei moleculare.* Termenul de "biologie moleculară" a fost introdus în 1950.

Biologia moleculară nu este o disciplină de sine stătătoare, ci reuneşte într-un corpus ştiinţific unitar, domenii care anterior erau complet independente (Microbiologia, Genetica, Biochimia). Biologia moleculară este un mod de a înţelege desfăşurarea proceselor biologice. Ea explică proprietăţile şi activităţile organismelor pe baze moleculare, aplicând sistemelor biologice, legi care guvernează sistemele mai simple (fizice şi chimice).

Orientarea moleculară a cercetărilor biologice, cristalizată în timp, a beneficiat de aportul Microbiologiei şi Virologiei, domenii care au furnizat modelul experimental al cuplului *E. coli* – fag λ. In acest context, Microbiologia a avut rolul unificator, deoarece diferitele tehnici (fizice, biochimice, genetice) şi rezultatele obţinute au fost raportate la acelaşi model experimental, făcând posibilă interpretarea lor corelativă. Sistemul biologic *E. coli* - fag λ a devenit cel mai bine cunoscut din întreaga lume vie, fiind cunoscute toate detaliile de structură, precum şi amplasarea pe cromosom a circa 80 de gene. Biologia moleculară este rezultatul utilizării convergente a mai multor tehnici experimentale de vârf, pentru studiul aceluiaşi model experimental. Consecinţa a fost consolidarea biologiei moleculare, concretizată în câteva realizări ştiinţifice fundamentale:

- elucidarea structurii acizilor nucleici şi a proteinelor;
- descoperirea codului genetic;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- descoperirea fluxului informaţiei genetice în celulă;
- descoperirea mecanismului molecular al biosintezei proteinelor;
- descoperirea proceselor de variabilitate, de recombinare şi de mutageneză;
- descoperirea bazelor moleculare ale proceselor de creştere şi diviziune celulară;
- descoperirea mecanismelor de reglare a activităţii celulare.

Aceste descoperiri ştiinţifice de excepţie, au justificat definirea perioadei 1950-'70, în termenii *revoluţiei biologiei moleculare*. Conceptele majore ale celor mai multe ştiinţe tradiţionale s-au reformulat pe baze moleculare. După 1970, două categorii de descoperiri ştiinţifice au influenţat decisiv evoluţia biologiei moleculare:

1) *Descoperirile care au infirmat o serie de dogme*:

- dogma centrală a biologiei moleculare, odată cu descoperirea reverstranscriptazei şi a transcrierii inverse (la retravirusuri);
- dogma "o genă – o enzimă", după evidenţierea genelor suprapuse şi a citirii defazate, la virusurile de dimensiuni mici;
- dogma citirii secvenţiale a informaţiei genetice (citirea fără pauze, odată cu descoperirea genelor discontinui);

2) *Descoperirea enzimelor de restricţie şi a plasmidelor* a deschis calea elaborării unor tehnici şi tehnologii de biologie moleculară, cunoscute astăzi sub denumirea de *inginerie genetică, geniu genetic* sau *tehnologia ADN recombinant*. Tehnicile de inginerie genetică se bazează pe posibilitatea *secţionării* moleculei de ADN, de diferite origini (animală, vegetală, fungică, bacteriană, virală), cu ajutorul unor enzime speciale denumite *endonucleaze de restricţie* şi a legării reasortate a unor fragmente, prin intermediul acţiunii altor enzime, denumite generic *ADN-ligaze*, în vederea transferului în alte celule.

Există posibilitatea ca genele transferate, să funcţioneze în celula acceptoare şi să determine sinteza de către celula respectivă, a unor substanţe noi, pe care în mod obişnuit, celula nu le produce. Microorganismele, cărora în mod artificial li se grefează gene străine, funcţionale sunt reprogramate genetic.

Un interes deosebit pentru tehnicile de inginerie genetică, l-a stârnit posibilitatea sintezei de către celulele de *E. coli* reprogramate, a unor molecule de o deosebită importanţă clinică: insulina, somatostatina, interferonii etc.

Tehnicile bazate pe metodologia ADN recombinant, au deschis calea unei noi revoluţii – *revoluţia biotehnologică* sau *bioindustrială*. Revoluţia biotehnologică este ferm orientată spre industria genetică, deoarece utilizează pe scară tot mai largă, microorganisme modificate genetic (reprogramate) prin tehnici de inginerie genetică.

Revoluţia biotehnologică este considerată ca una din perspectivele de mare succes ale studiului microorganismelor. La baza ei stau descoperirile făcute, în primul rând, pe celulele de *E. coli*. Cunoaşterea aprofundată a celulei de *E. coli* a condiţionat, ca majoritatea transferurilor de gene să se facă la acest organism, care a devenit astfel un adevărat "cobai" al biologiei moleculare.

Enzimele de restricţie

Până în 1960, izolarea unei gene cromosomale părea imposibilă. Prin procedeul fragmentării mecanice a ADN, obţinerea unui fragment de lungimea unei singure gene din genomul mamiferelor are o şansă foarte mică (1/100 000). Purificarea unui astfel de fragment este imposibilă.

Soluţia practică a izolării genelor, a fost adusă de *enzimele de restricţie*, care au activitate de *endonucleaze*. Studiul lor a început odată cu descoperirea că unele bacterii au capacitatea de a rezista infecţiei fagice, deoarece posedă enzime care atacă şi clivează ADN de provenienţă exogenă (străină).

Enzimele de restricţie se găsesc la cele mai multe microorganisme procariote, dar lipsesc la eucariote. Diferenţa netă a distribuţiei lor este parţial explicată, prin aceea că în lumea procariotelor există un flux genetic deosebit de intens, fără echivalenţă în lumea vie. Enzimele de restricţie au rolul de a recunoaşte şi de a degrada ADN exogen, limitând replicarea sa şi propagarea în generaţiile celulare ulterioare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Enzimele de restricţie au următoarele proprietăţi definitorii:

- recunosc ca străine secvenţele din molecula de ADN exogenă şi o clivează, făcând-o nefuncţională, fiind enzime cu activitate endonucleazică;

- enzimele de restricţie sunt asociate în celula bacteriană, cu *enzimele de modificare*. Ultimele recunosc aceleaşi secvenţe de ADN străin şi le modifică, astfel încât nu mai pot fi clivate de endonucleaze.

Enzimele de *restricţie-modificare* formează un sistem funcţional unitar şi au rolul de "santinele genetice" ale celulei. Enzimele de restricţie şi modificare recunosc aceiaşi secvenţă de ADN, dar realizează activităţi enzmatice diferite.

Se cunosc *trei clase* de enzime de restricţie, notate cu I, II şi III. Molecula de enzimă de restricţie de tip I cumulează funcţiile de nuclează (produce clivarea) şi de modificare prin metilare. Trei situsuri distincte ale aceleiaşi molecule realizează funcţiile de *recunoaştere, clivare şi modificare*. Fragmentele de ADN rezultate sunt heterogene ca mărime şi nu pot fi utilizate pentru clonare sau pentru analiza structurală a ADN.

Restrictazele de tip II au numai funcţie endonucleazică şi clivează molecula de ADN în fragmente de dimensiuni relativ egale, utilizabile pentru clonare.

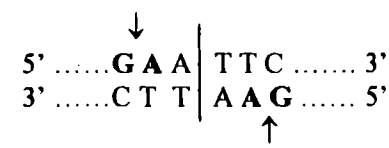
Restrictazele de tip III se deosebesc de cele de tip I, prin aceea că nu au funcţia de modificare. Fragmentele de ADN care rezultă, sunt heterogene.

Nucleazele taie legăturile fosfodiester ale lanţurilor polinucleotidice. Cele ce taie preferenţial legăturile interne se numesc *endonucleaze*, iar cele care secţionează nucleotidele terminale se numesc *exonucleaze*.

Mecanismul de acţiune a enzimelor de restricţie

Mult timp după descoperirea lor, s-a considerat că endonucleazele acţionează nespecific, adică clivează molecula de ADN în orice punct, indiferent de secvenţa bazelor. Endonucleazele de restricţie clivează fragmentele de ADN numai la nivelul unor secvenţe de 4-8 baze, care au caracter de *palindrom*, adică ordinea bazelor în direcţia 5' → 3' pe o catenă este aceiaşi şi pe catenă opusă în aceiaşi direcţie 5' → 3'.

De exemplu, restrictaza Eco R1 recunoaşte secvenţa:



Situsul de acţiune a enzimei, pe cele două catene este decalat, fiind localizat între nucleotidele marcate cu simboluri în relief.

Deoarece aceiaşi secvenţă de baze, dar orientată în direcţii opuse se găseşte pe ambele catene, enzimele de restricţie creează totdeauna ruperi dublu catenare. Ruperile se produc aproape simultan, deoarece multe enzime de restricţie, sub forma dimerilor, se leagă de ambele situsuri de recunoaştere pe cele două catene. Adeseori, situsul de recunoaştere este şi situs de clivare. Dacă cele două catene ale moleculei de ADN sunt secţionate la acelaşi nivel rezultă fragmente cu capete tăiate drept (blunt ended). Alte enzime secţionează decalat pe cele două catene, la o oarecare distanţă de axul de simetrie a palindromului şi astfel rezultă fragmente de ADN cu extremităţi monocatenare *lipicioase* (sticky ends), care se pot lega prin complementaritate şi generează structuri moleculare circulare.

Palindroamele recunoscute de enzimele de restricţie sunt relativ scurte. Dicontinuităţile create nu sunt reparate de *enzimele de reparare*.

Se cunosc peste 100 de endonucleaze cu specificităţi diferite, izolate de la peste 300 de specii de microorganisme procariote. Pentru ingineria genetică, aceste enzime sunt instrumente esenţiale de lucru, adevărate "bisturie biochimice", care secţionează moleculele de ADN. Din moleculele mari de ADN se obţin fragmente mici. Secvenţele scurte de diferite origini pot fi legate sub acţiunea ADN-ligazei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Enzimele de modificare

Modificarea este procesul biochimic prin care unele enzime specifice sintetizate de bacterii, modifică natura bazelor la nivelul unor secvenţe de ADN, recunoscute de enzimele de restricţie. Secvenţele modificate devin rezistente la acţiunea endonucleazelor de restricţie.

Pentru fiecare endonuclează de restricţie trebuie să existe o enzimă de modificare. Cel mai adesea, modificarea se realizează prin *metilare* la situsuri specifice sub acţiunea metilazelor. De exemplu, restrictaza Eco R II recunoaşte secvenţa:

G C A G G .....
G G T C C .....

Enzima de modificare metilează citozina:

m
C **C** A G G .....
G G T **C** C .....
m

O secvenţă de nucleotide poate fi substratul acţiunii unei enzime de restricţie sau de modificare, dar niciodată pentru ambele.

La procariote, circa 1% din totalul bazelor sunt metilate. Cel mai adesea este metilată *adenina* (sub forma metil-adeninei) şi cu o frecvenţă mai mică se metilează *citozina* (sub forma metil-citozinei). Modificarea prin metilare se realizează pe ambele catene ale moleculei de ADN, în cursul replicării acesteia.

Simultan cu enzimele de restricţie-modificare s-au descoperit alte categorii de enzime:

- *ligazele*, enzime capabile să adauge nucleotide la extremitatea moleculei de ADN, să lege covalent cele două extremităţi şi să formeze o moleculă lineară recombinată sau respectiv, o molecula circulară. Cea mai utilizată ligază comercială este cea codificată de fagul T_4;

- *terminal-transferazele*, enzime care catalizează adăugarea nucleotidelor la extremitatea 3' a moleculei de ADN în curs de sinteză, fără să necesite matriţa şi chiar pot să creeze extremităţi adezive.

Restrictazele, ligazele şi terminal-transferazele sunt instrumentele de lucru ale ingineriei genetice. Restrictazele taie fragmentele de ADN, iar ligazele reunesc capetele rezultate. Foarte important şi definitoriu pentru ingineria genetică, este faptul ca fragmentele de ADN rezultate sub acţiunea unei restrictaze, pot fi reunite (recombinate), indiferent de provenienţa lor. Se obţin astfel molecule *himere*.

Moleculele recombinate de ADN stau la baza restructurării profunde a conţinutului microbiologiei industriale.

Cea de a II-a categorie importantă de molecule pentru biotehnologie sunt *plasmidele*. Ele au capacitatea de a încorpora în structura lor, gene de provenienţă străină şi de a le transmite cu o frecvenţă mare, de la o celulă la alta.

In al II-lea rând, biotehnologia se bazează pe perfecţionarea *in vitro*, a tehnicilor de transfer de material genetic la bacterii şi la levuri, prin care se modelează mecanismele de transfer care au loc în mod natural.

Etapele reprogramarii microorganismelor prin tehnologia ADN recombinant (clonarea moleculară)

Ingineria genetică la nivel celular, prin fuziunea protoplaştilor realizează transferul necontrolat al genelor de la o celulă la alta. Metodele ingineriei genice, bazate pe acţiunea enzimelor de restricţie asigură clivarea controlată şi obţinerea fragmentelor de ADN de dimensiunea genelor individuale. Ele oferă posibilitatea izolării genelor şi transferului lor în celula receptoare.

Tehnicile de inginerie genică moleculară sau tehnologia ADN recombinant, având ca model transferul unor gene din celula animală, în celulele bacteriene, se desfăşoară în următoarele etape:

1) *Izolarea genei naturale* sau sinteza chimică a moleculei de ADN care codifică molecula proteică cu semnificaţie practică;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) *Selecţia unui "vehicul" sau vector* adecvat şi inserţia genelor străine în molecula vector şi obţinerea unei molecule himere;

3) *Transferul moleculei vector* în celula bacteriană;

4) *Selecţia celulelor* modificate genetic.

Obţinerea unei molecule hibride de ADN prin recombinare in vitro şi amplificarea ei numerică într-o populaţie bacteriană se numeşte clonare.

Pentru a fi perpetuate, genele clonate trebuie să devină parte componentă a moleculei de ADN, care este replicată la fiecare ciclu de diviziune.

Obţinerea fragmentelor de ADN utilizate pentru clonare

Prima etapă a clonării moleculare este alegerea sursei donoare de material genetic şi obţinerea fragmentelor de ADN. Sursa de ADN poate fi o celulă procariotă sau eucariotă (fungică, vegetală, animală) sau un virus. Din celule se purifică ADN şi ulterior, fragmentele utilizabile în etapa clonării se obţin prin diferite metode, ţinând seama de faptul că fragmentele care se pot clona sunt relativ mici, între 1000-2000 perechi de baze. Un astfel de fragment trebuie să conţină secvenţa integrală a unei gene şi cât mai puţin ADN neinformaţional.

Fragmentarea ADN se realizează cu ajutorul enzimelor de restricţie. Mărimea fragmentelor de ADN obţinute este determinată de mărimea situsului de recunoaştere a enzimei şi de frecvenţa cu care situsul respectiv se întâlneşte de-a lungul moleculei de ADN. Cu cât situsul de recunoaştere este mai mic, cu atât şansa repetării sale este mai mare şi fragmentele rezultate sunt mai mici. Dintr-un cromosom mamalian rezultă $10^5 - 10^7$ fragmente, care se separă după dimensiuni.

Moleculele de ADN se pot fragmenta mecanic, prin agitare în suspensie, într-un mixer special (waringblender) şi rezultă fragmente de circa 3000 perechi de baze.

Tehnologia ADN recombinant a fost folosită şi pentru clonarea unor gene, a căror identificare prin fragmentarea genomului nu este posibilă, dar pentru care, în celulă se găseşte ARNm. Din celulă se izolează ARNm, iar prin transcriere inversă, *in vitro* se obţine o copie de *ADN complementar* (ADNc). Astfel, se elimină diversitatea moleculelor de ADN dintr-un amestec. Moleculele de ADNc sunt convertite la ADN dublu catenar.

ADNc se deosebeşte de ADN genomic, deoarece ARNm este prelucrat prin clivare şi înădire. Metoda este limitată la clonarea genelor de ADNc, al căror ARNm se găseşte în citoplasmă, în cantitate semnificativă.

Dacă proteina are dimensiuni mici, gena codificatoare se obţine prin sinteză chimică. Se determină secvenţa aminoacizilor şi se sintetizează o molecula de ADN cu codonii corespunzători. Genele astfel sintetizate au caracter continuu, sunt lipsite de introni şi sunt adecvate transcrierii şi traducerii în celula bacteriană: gena pentru somatostatină (un hormon de 14 aminoacizi), gena pentru hormonul de creştere, gena pentru insulină şi cea codificatoare pentru timozină.

In general, genele celulare eucariote sunt prea mari pentru a fi sintetizate chimic şi spre deosebire de genele bacteriene, sunt adesea gene discontinui (mozaicate).

Alegerea "vehiculului" sau vectorului adecvat ca purtător şi cuplarea cu fragmentul de ADN. Pentru ca fragmentul de ADN să fie transferat în celula receptoare este necesar un purtător denumit *vector* sau *vehicul* de clonare, deoarece ADN din celula eucariotă nu poate fi încorporat direct în cromosomul bacterian. ADN exogen nu are capacitate de replicare autonomă şi nici nu se menţine în stare autonomă, deoarece este sensibil la acţiunea nucleazelor citoplasmatice.

Vectorii sunt molecule de ADN cu capacitatea de replicare autonomă. De cele mai multe ori, vectorii sunt reprezentaţi de o *plasmidă* sau de un *fag temperat*, ce pot să lege fragmentul de ADN în care se găseşte gena ce urmează a fi clonată.

Vectorii ideali au următoarele proprietăţi:

- sunt relativ mici;
- se replică independent (autonom) în celulă, deoarece au o origine a replicării;
- se purifică uşor ca unităţi întregi din acizii nucleici ai celulei gazdă;
- au situsuri de acţiune a enzimelor de restricţie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La nivelul unui situs de restricţie, genomul vehiculului de clonare va fi secţionat cu aceiaşi enzimă de restricţie, care a generat fragmentele de ADN străin, creind posibilitatea legării celor două genomuri.

Plasmidele naturale, ca şi fagii nu îndeplinesc toate condiţiile enunţate. De aceea, s-au creat noi vectori, pornind de la cei naturali. Plasmida pBR_{322} este cel mai cunoscut vector de clonare şi conţine o cantitate minimă de ADN. Plasmidele pot lega fragmente de 10-12 kbp. Fragmentele mai mari tind să fie instabile şi pierd cea mai mare parte a ADN străin. Rata replicării plasmidelor, scade odată cu creşterea dimensiunilor.

Dintre fagi, cel mai utilizat vector este fagul λ care infectează *E. coli*. Genomul său are circa 48 kb. Regiunea sa centrală, de 20 kb, poate fi înlocuită cu ADN străin, deoarece partea stângă (19 kb) şi cea dreaptă (lo kb) conţin toată informaţia genetică necesară replicării fagului. S-a creat astfel o varietate de vectori fagici, care poartă 1-20 kb de ADN străin, fără să afecteze replicarea şi împachetarea normală a cromosomului λ în fagii progeni.

Fagul λ, purtător al fragmentului de ADN străin, se multiplică în celulele de *E. coli* şi formează genomuri concatemere, în care situsurile fagice *cos*, care semnifică împachetarea, sunt aşezate la distanţa de 50 kb. Mecanismul împachetării, orientată de situsurile *cos*, nu distinge ADN fagic de cel străin. Astfel, lungimea moleculelor recombinate, împachetate, este condiţionată de prezenţa situsurilor *cos* pe molecula de ADN. Fagii purtători ai fragmentului de ADN străin, sunt infecţioşi pentru bacteriile sensibile, ca şi fagul natural.

Al III-lea tip de vector, combină unele particularităţi ale plasmidelor şi fagilor şi se numeşte *cosmid*. Vectorii *cosmizi* sunt hibrizi între *plasmide* (care îşi păstrează funcţia de replicare şi markerii de rezistenţă) şi *fagi*, de la care păstrează situsurile *cos*, ceea ce le permite să fie împachetaţi în capsida fagică. Aceşti vectori permit legarea şi clonarea unor fragmente mari de ADN, de până la 50 kbp.

Alegerea celulelor ca suport al clonarii genelor. Molecula hibridă sau himeră, rezultată prin legarea ADN străin de vectorul de clonare, trebuie transferată într-o celula bacteriană adecvată replicării. Cel mai adesea, transferul s-a realizat în celulele de *E. coli* şi *B. subtilis*.

Transferul propriu-zis se poate face pe una din următoarele trei căi:

- transformare genetică, prin inducerea competenţei artificiale a celulelor receptoare cu $CaCl_2$:
- prin conjugare;
- prin transducţie genetică.

Consecutiv replicării genelor clonate în substratul celular adecvat, s-au creat colecţii de plasmide sau fagi, fiecare purtând un fragment de ADN, denumite "bănci de gene". Într-o bancă ideală se va găsi întregul genom al organismului, ca un set de fragmente clonate independent. De regulă, lipsesc unele fragmente de ADN, fie datorită lipsei situsurilor de acţiune pentru enzimele de restricţie, fie pentru că unele gene sunt letale pentru celula gazdă.

Clonarea este o etapă complexă, atât din punct de vedere molecular, cât şi al realizării tehnice. Din punct de vedere molecular, clonarea corespunde *grefării genelor* străine în celula receptor, replicării şi exprimării lor în noua gazdă. Din punct de vedere tehnic, clonarea constă în *selectarea* celulelor modificate genetic ale populaţiei respective, care vor perpetua vectorul în generaţiile de celule.

Clona celulară reprezintă o populaţie de celule rezultată din reproducerea asexuată a unui organism, astfel încât toate celulele populaţiei respective sunt identice din punct de vedere genetic şi sunt identice cu celula parentală. Bacteriile reprogramate genetic sunt considerate tulpini mutante ale celulelor parentale, deoarece cel mult 1% din materialul lor genetic este nou.

Posibilitatea clonării genelor într-un organism, căruia în mod natural îi lipseşte informaţia omologă a oferit o modalitate cu totul originală de a studia bazele moleculare ale organizării genelor şi reglării lor, precum şi calea modificării organismelor prin modificarea căilor metabolice.

Spectrul de gazdă a genelor clonate a fost extins la vectori ai celulelor eucariote: se folosesc plasmide ale levurilor sau ADN al unor virusuri infecţioase pentru organismul animal. S-au obţinut vectori prin fuziunea a doi repliconi, unul bacterian şi altul cu originea în celula eucariotă, cu capacitatea de replicare, atât în celula bacteriană, cat şi în celula eucariotă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Genele celulelor eucariote, clonate în celula bacteriană nu sunt transcrise de la promotorii proprii, deoarece aceştia nu sunt recunoscuţi de ARN-polimeraza bacteriană. De aceea, pentru exprimarea unei gene în celula bacteriană, este necesară cuplarea cu o secvenţă promotoare bacteriană.

O altă problemă importantă este că fragmentul de ADN generat de o endonuclează de restricţie, nu conţine numai gena codificatoare a moleculei biologic active, ci şi secvenţele care o flanchează şi care trebuie clivate. Eliminarea lor se face într-o etapă suplimentară, denumită etapa *subclonării*. Pentru aceasta, fragmentul de ADN recuperat după clonarea primară este supus clivării cu diferite enzime de restricţie.

Aplicaţii ale clonării moleculare

Clonarea fragmentelor de ADN, purtătoare de informaţie genetică a revoluţionat studiul multor domenii ale biologiei. Cele mai importante sunt următoarele :

1. Cunoaşterea organizării genomurilor de dimensiuni mici este rezultatul clonării ADN şi al metodelor de scvenţiere a bazelor. S-a determinat secvenţa completă a bazelor în plasmide şi a genomului mai multor virusuri.

2. Înţelegerea geneticii celulei eucariote. Prin clonarea ADN şi folosirea ADN clonat în tehnicile de hibridare, s-au evidenţiat schimbările ce au loc în organizarea genelor în timpul maturării limfocitelor, a genelor ce determină schimbările antigenicităţii tripanosomelor.

3. Producerea substanţelor de mare valoare biologică. Celulele care primesc o genă clonată într-un vector, pot sintetiza cantităţi mari ale substanţei codificate de gena respectivă.

4. Studiile de înlocuire a genelor şi mecanismele reglării activităţii genelor în celula eucariotă. În acest sens, şoarecii transgenici sunt un exemplu elocvent. Ei rezultă prin injectarea în nucleul celulei, a unei gene clonate. Fragmentul de ADN clonat se integrează la situsuri diferite în cromosomii celulei ou. Se oferă astfel, posibilitatea studiului diferenţierii celulare asupra expresiei genice, ca şi a interacţiunilor genice. O posibilă viitoare aplicaţie la om a metodologiei de clonare, este terapia genică, prin introducerea unei gene clonate în celulele somatice ale unui organism (celule ale măduvei osoase sau ale liniei germinale), pentru a compensa un defect genetic.

Realizări ale biotehnologiei cu microorganisme

Domeniul care pare să aibă cele mai multe avantaje ale biotehnologiei cu microorganisme reprogramate genetic este cel *chimio-farmaceutic*. Prin metodologia biotehnologică se produc hormoni, substanţe imunostimulatoare (sau adjuvante), capabile să stimuleze răspunsul imun al organismului animal şi uman.

Sinteza în celulele bacteriene, a unei poteine animale cu activitate biologică, presupune depăşirea unor dificultăţi suplimentare celor obişnuite de clonare:

- bacteriile nu prelucrează ARNm transcris din ADN al unei gene eucariote şi nu elimină secvenţele neinformaţionale (intronii):
- nu clivează secvenţele suplimentare ale precursorilor proteinelor mature;
- nu realizează glicozilarea proteinelor sintetizate.

Totuşi, unele proteine specifice celulei eucariote sunt sintetizate de bacteriile reprogramate genetic, în forma lor activă. De exemplu, genele codificatoare ale interferonilor nu au secvenţe necodificatoare şi în consecinţă, ARNm nu trebuie să fie clivat şi înădit, iar moleculele de interferon produse de leucocite, fie că nu sunt glicozilate, fie că-şi păstrează activitatea biologică în absenţa glicozilării. Această restricţie impusă de necesitatea prelucrării ARNm, prin eliminarea intronilor, pentru alte proteine este depăşită folosind ADNc.

În general, proteinele care se secretă sunt produse în cantităţi mult mai mari decât acelea care se acumulează în celula bacteriană, unde tind să sufere denaturare şi digestie. Condiţiile reducătoare din celulă, împiedică formarea legăturilor S-S stabilizatoare pentru cele mai multe proteine extracelulare.

La *E. coli* s-au transferat genele pentru sinteza *insulinei*. Avantajele insulinei bacteriene sunt mari, deoarece ea înlocuie insulina din pancreasul de porc sau bovine. Randamentul de extracţie a insulinei pancreatice este de numai 2 000 UI/kg ţesut, ceea ce explică criza de insulină pe plan mondial. In plus, insulina animală se deosebeşte de cea umană, prin

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

aminoacizii din pozitiile 8, 9, 10 şi este, prin urmare, o substanţă non-self. După administrare îndelungată, la persoanele cu reactivitate imunitară mare, se sintetizează anticorpi anti-insulină. Insulina administrată, este legată imediat în complexe reversibile antigen-anticorp, din care se eliberează necontrolat, provocând şocul hiperinsulinemic, cu hipoglicemie marcată. Insulina bacteriană, fiind codificată de gena sintetizată chimic, este identică din punct de vedere chimic cu cea umană. Randamentul de obţinere a insulinei prin metode biotehnologice este foarte mare: circa 100 000 molecule/celulă bacteriană.

Somatostatina este hormonul hipotalamic reglator al creşterii, inhibitor al sintezei de STH hipofizar, izolat de R. Guillemin. Poate fi produsă de *E. coli* manipulată genetic, purtătoare a genei obţinută prin sinteză chimică.

Hormonul de creştere (STH) produs de adenohipofiză, ridică probleme medicale deosebite, pentru că are un grad înalt de specificitate a acţiunii sale. Se utilizează în tratamentul nanismului, numai hormonul extras din lobul anterior al hipofizei umane, imediat după moarte. Acesta este un material foate greu de procurat, care în plus prezintă riscul infecţiilor lente. Astăzi, STH se obţine prin biosinteză în celulele de *E. coli*, purtătoare ale genei obţinută prin sinteza chimică, cu secvenţă corespunzătoare celei umane.

Interferonul se obţine, în mod obişnuit, din leucocite, în centrele hematologice specializate. Este folosit pentru tratamentul unor forme de cancer, dar producerea sa este foarte costisitoare, pentru un bolnav fiind necesare circa un miliard de unităţi. Biosinteza sa în celulele de *E. coli* clonate, purtătoare ale genei umane este mult mai ieftină. Sinteza moleculelor active de interferon este posibilă numai dacă în ADN plasmidial s-a inclus acea parte a genei care codifică aminoacizii sai, fără codonii care specifică traducerea peptidului semnal.

Culturile de celule animale sunt utilizate pentru producerea factorilor necesari tratamentului *hemofiliei*. Anterior, aceşti factori erau izolaţi din sânge, cu un mare risc de a transmite virusurile hepatitie B, C sau HIV.

Obţinerea unor proteine sanguine de coagulare prin tehnologia ADN recombinant face aceste substanţe mai uşor disponibile pentru persoanele cu hemofilie sau alte dezordini sanguine.

Au fost sintetizate artificial şi clonate în celulele de *E. coli*, genele ce codifică *proteine reglatoare ale circulatiei sângelui* (bradikinina, angiotensina), precum şi gene ce codifică sinteza *mediatorilor sinapselor neuronale* (endorfine).

ADN recombinant este folosit pentru producerea *vaccinurilor*, mai ieftine şi în cantităţi mai mari. Clonarea genelor în celulele de levuri a făcut posibilă obţinerea antigenului HBs (antigen Australia), precum şi a glicoproteinelor altor virusuri: HSV, VEB, HIV, RSV. Aceste vaccinuri, mai ieftine şi mai specifice, produc mai puţine efecte secundare.

Tehnologia ADN recombinant a fost utilizată pentru diagnosticul defectelor genetice fetale, prin metoda studiului enzimelor în celulele fetale din lichidul amniotic. Defectele sunt detectate, folosind ADN recombinant cu o secvenţă cunoscută de nucleotide. Eroarea ADN fetal este echivalentă cu absenţa enzimelor sau cu sinteza unor enzime nefuncţionale. Este posibilă inserţia genei absente sau înlocuirea celei defecte (terapie genică).

Experţii pot determina paternitatea cu precizie de 99%, pe baza comparării probelor de ADN, iar "amprenta ADN" recoltată din lichidul spermatic, din sânge sau din celulele firului de păr, este folosită în medicina legală.

În biotehnologie, procesele de fermentaţie alcoolică, producerea antibioticelor şi a altor substanţe pot fi ameliorate prin tehnicile de ADN recombinant. De exemplu, inserţia genelor pentru sinteza amilazei la *Saccharomyces* ar face posibilă obţinerea alcoolului din amidon. Etapa de zaharificare a amidonului pentru obţinerea berii nu ar mai fi necesară. Vinul ar putea fi obţinut din sucuri care conţin amidon, în loc de glucide simple.

Degradarea celulozei şi a ligninei, producerea unor substanţe combustibile, îndepărtarea poluanţilor şi biosolubilizarea ("leşierea") metalelor din minereurile sărace, sunt procese naturale, dar viteza desfăşurării lor poate fi mult accelerată prin utilizarea unor bacterii manipulate genetic. Leşierea industrială sau extracţia metalelor din minereurile sărace de cupru şi uraniu, este deja făcută de bacterii din g. *Thiobacillus*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tulpinile de *Pseudomonas putida*, care degradează diferite componente din petrol pot fi manipulate astfel, încât o tulpină să metabolizeze toate componentele petrolului şi să fie utilizată pentru depoluare.

În *agricultură*, tehnologia ADN recombinant este folosită în scopul controlului insectelor dăunătoare. Genele toxinei de *B. thuringiensis* au fost transferate la *Ps. fluorescens*, iar acestea se aplică pe seminţele de cereale. Astfel, toxina se prodce în jurul rădăcinilor plantei, având efect protector faţă de insecte.

Prin tehnologia ADN recombinant se încearcă obţinerea unor soiuri de plante cu randament productiv superior, dar care să fie rezistente la ierbicidele folosite pentru combaterea buruienilor.

Tehnologia ADN recombinant a stat la baza creării *băncilor de gene* ale diferitelor orgânisme: om, *Drosophyla*, şoarece, *X. laevis*, levuri, bacterii, virusuri. Fiecare bancă este o colecţie de molecule hibride de ADN, care cuprinde genele unei specii. Idealul este ca banca să conţină tot setul de gene ale unui organism.

Extinderea metodelor de inginerie genetică la nivelul celulei animale este legată de identificarea moleculelor vectoare. Acestea trebuie să aibă calitatea nu numai de a lega materialul genetic străin, dar să permită şi replicarea acestuia.

Dezavantajele clonării genelor animale şi umane în celula bacteriană provin din următoarele aspecte:

- cele mai multe clonări de gene s-au făcut în celulele de *E. coli* K_{12}. Ca orice bacterie Gram negativă, *E. coli* nu secretă uşor produsele de sinteză, care astfel se acumulează în citoplasmă şi sunt parţial denaturate;
- celulele bacteriene nu produc modificări specifice, esenţiale pentru activitatea biologică a produselor de sinteză: glicozilări, fosforilări, carboxilări;
- unele molecule sintetizate de gene clonate în celula bacteriană sunt pliate anormal şi dobândesc o configuraţie spaţială modificată (de exemplu, IL-2), ceea ce le conferă caracter nonself şi după administrare induc sinteza anticorpilor. Activitatea lor biologică este modificată în raport cu a moleculei native.

Perspectivele utilizării bacterilor reprogramate genetic. Pentru viitor se apreciază că multe substanţe chimice care în prezent se obţin prin sinteză, vor fi produse de către microorganismele modificate genetic, deoarece foarte multe procedee de sinteză chimică industrială au ca punct de plecare petrolul şi derivaţii săi. O bună parte a industriei petrolului va evolua spre bioindustrie. In viitor, pe cale biotehnologică, se vor produce combustibili neconvenţionali: metanol, etanol, metan, H_2, petrol sintetic.

Microorganismele reprogramate genetic prin tehnologia ADN recombinant vor fi folosite pentru recuperarea metalelor neferoase din zăcămintele sărace şi din depozitele de steril, pentru extracţia petrolului (70% rămâne în zăcământ), pentru combaterea poluării cu petrol.

UTILIZAREA MICROORGANISMELOR ÎN BIOTEHNOLOGIE

În mediile naturale, microorganismele au un rol esenţial în realizarea circuitului elementelor biogene în natură: C, N, S, P etc. Microorganismele au un rol foarte important în industria alimentară, în industria petrolieră, în industria farmaceutică etc.

În anul 1923, în SUA a început producerea bioindustrială a *acidului citric*, iar de atunci microorganismele sunt folosite pentru producerea pe cale industrială a unor substanţe de importantă practică deosebită. Utilizarea microorganismelor în scop bioindustrial (sau biotehnologic) este cunoscută sub diferite denumiri: *biotehnologia microorganismelor, ingineria microorganismelor sau ingineria biochimică.*

Biotehnologia se deosebeşte de ştiinţă, prin obiectul preocupărilor sale, care este tehnica biologică, dar este ştiinţifică prin metoda de lucru.

Prin biotehnologie se înţelege exploatarea industrială a potenţialitatii productive a microorganismelor, a celulelor vegetale sau animale sau a fracţiilor subcelulare derivate, cu scopul de a obţine produse utile, cu valoare economică ridicată. Termenul este format din două cuvinte: *bios* şi *tehnos* şi semnifică tehnologia unui proces de producţie cu celule vii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Biotehnologia şi bioindustria sunt termeni cu sens echivalent. Din punct de vedere practic, biotehnologia (bioindustria) nu reprezintă un domeniu nou. Ea a intrat de mult în sfera forţelor de producţie a societăţii. Toate tehnologiile fermentative alimentare (producerea vinului, a pâinii, a berii, a derivatelor lactate), precum şi cele de biosinteză a aminoacizilor, a acizilor organici, a enzimelor şi antibioticelor sunt *biotehnologii clasice*. Sunt excluse din sfera biotehnologiei, tehnologiile medicale (cu excepţia celor de obţinere a vaccinurilor şi a produselor biologice de diagnostic), tehnologiile agricole convenţionale şi cele de ameliorare a plantelor şi animalelor.

Sectorul cel mai dinamic al biotehnologiei este acela care utilizează *microorganismele*. El a furnizat şi bazele teoretice de modificare a zestrei genetice a organismelor.

Cultivarea microorganismelor în scop industrial se face în instalaţii speciale, denumite bioreactoare.

Bioreactoare

Bioreactoarele sunt instalaţii în care un substrat material este transformat de un catalizator biologic (enzime sau microorganisme). Bioreactoarele cele mai răspândite folosesc microorganismele sub formă liberă sau imobilizată. O altă denumire a bioreactorului este aceea de *fermentor*.

Bioreactoarele pot funcţiona în trei moduri:

- cultivarea *discontinuă* ("batch"), în care substratul şi microorganismele sunt introduse în etapa iniţială a procesului. Procesul microbiologic discontinuu este caracterizat prin succesiunea a trei faze: de latenţă, exponenţială şi staţionară, care precede liza celulelor;
- cultivarea *continuă* presupune reînoirea mediului cu o rată constantă. Debitul mediului reînoit se poate regla, fie prin menţinerea constantă a compoziţiei chimice a fermentorului (*chemostat*), fie prin menţinerea constantă a densităţii microorganismelor (*turbidostat*);
- cultivarea *semicontinuă*, în care mediul nutritiv este adăugat în manieră continuă, fără extragerea produsului de fermentaţie.

Fazele cultivării unui microorganism industrial

Într-o cultură staţionară a unui microorganism industrial, în general, se succed două faze:

a) Faza de *creştere* a culturii, denumită *trofofaza*, corespunzătoare perioadei de multiplicare rapidă şi de acumulare a masei celulare.

b) Faza de *producţie* sau faza metabolismului secundar, denumită *idiofaza*, corespunzătoare încetinirii ritmului de creştere, deşi celulele rămân active metabolic.

Substanţele de importanţă industrială furnizate de microorganisme sunt *produşi de metabolism* şi *produşi de bioconversie*.

Produşii de metabolism pot fi:

a) *Produşi ai metabolismului energetic*, rezultaţi în procesele fermentative (alcoolică, lactică, butirică, acetono-butilică, propionică, 2,3-butan-diolică). Alcoolul etilic se formează în faza primară.

b) *Metaboliţi primari*: aminoacizi, vitamine, enzime, nucleotide, acizi organici. Metaboliţii primari sunt molecule mici, esenţiale pentru celulă şi se sintetizează preponderent în timpul fazei de creştere primară (trofofază). Unii metaboliţi primari (acidul glutamic, vitamina B_{12}, acidul citric) se sintetizează în idiofază.

c) *Metaboliţi secundari*: antibiotice, alcaloizi (ergotina), stimulatori ai creşterii plantelor (gibereline).

Produsele de bioconversie, denumite bioderivaţi, se formează din substrat prin modificări minime, sub acţiunea microorganismelor: acidul acetic (prin oxidarea etanolului), acidul gluconic (prin oxidarea glucozei); hormonii corticosteroizi (prin conversia steroizilor); vitamina C (beta-sorbitolul este oxidat la L-sorboză) etc.

Apartenenţa la grupul metaboliţilor primari sau secundari nu se corelează strict cu faza în care ei sunt sintetizaţi, ci cu rolul lor în viaţa celulei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Metaboliţii secundari sunt substanţe neesenţiale pentru viaţa celulei şi se sintetizează la sfârşitul fazei de creştere primară, sau chiar în faza staţionară a culturii, denumită *idiofază*, când o sursă nutritivă s-a epuizat şi creşterea echilibrată nu mai este posibilă. Sinteza metaboliţilor secundari este expresia proceselor de diferenţiere biochimică.

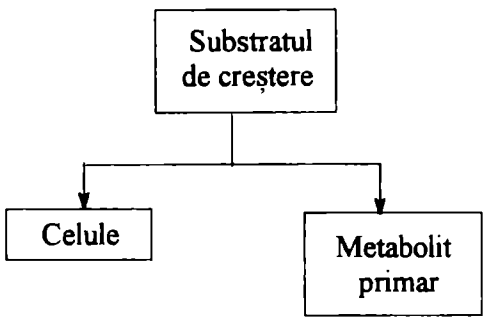
Cei mai importanţi, din punct vedere industrial, sunt metaboliţii secundari.

În condiţiile *cultivării continui* (în chemostat sau în turbidostat), cele două faze nu sunt separabile, ci coexistă.

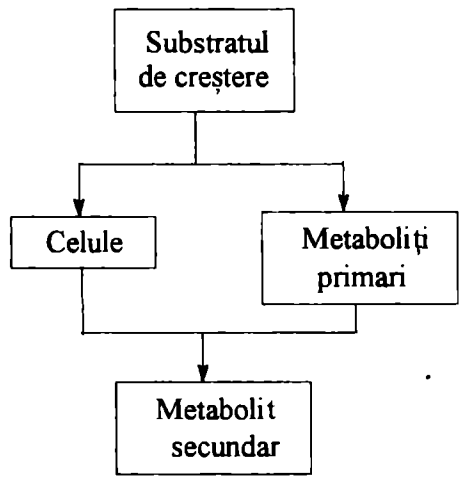
Metaboliţii secundari au următoarele caracteristici:

- au un grad relativ mare de specificitate (adică fiecare metabolit este sintetizat de un număr mic de tulpini de microorganisme);
- nu sunt esenţiali pentru creşterea celulelor
- sinteza lor este dependentă de compoziţia mediului
- sunt produşi ca un grup de compuşi înrudiţi, cu mici variaţii biochimice.

Dacă un proces biotehnologic urmăreşte obţinerea unui metabolit primar, faza de creştere logaritmică va fi extinsă cât mai mult cu putinţă. Pentru obţinerea metaboliţilor secundari, fazele de lag şi de creştere exponenţială, vor fi reduse ca durată, dar se va extinde faza staţionară sau se va favoriza creşterea lentă pe toată durata procesului.



Creșterea și producerea metaboliților primari sunt procese simultane.



În prima etapă se sintetizează metaboliții primari, pe seama cărora celulele cresc. Metaboliții secundari se sintetizează tardiv.

Cele mai răspândite biotehnologii sunt cele care exploatează capacitatea microorganismelor de a face biosinteze de mare interes practic.

Un microorganism industrial trebuie să răspundă următoarelor criterii:

- să crească rapid pe un substrat ieftin, pe care să-l transforme, producând cantităţi maxime de produs final util şi cantităţi minime de produse secundare;
- să tolereze concentraţii mari de produs final, fără să-l metabolizeze;
- să realizeze transformarea metabolică a substratului în condiţii cât mai economice, astfel încât produsul final să nu necesite utilizarea metodelor de extracţie complicate şi costisitoare;
- microorganismele selecţionate sau reprogramate genetic, să-şi păstreze în timp, proprietăţile metabolice particulare, fără riscul variaţiilor genetice.

Scopul biotehnologiilor cu microorganisme

Procesele biotehnologice cu microorganisme au ca scop obţinerea *biomasei* sau a unor *substanţe* cu utilizări foarte diverse. Domeniile majore care beneficiază de produsele microbiologiei industriale sunt cel farmaceutic, agricol, alimentar, chimic şi protecţia mediului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Biomasa obţinută prin cultivarea microorganismelor (single cell protein) are un conţinut ridicat de proteine, în care se găsesc aminoacizi esenţiali. Pentru obţinerea biomasei se cultivă bacterii aerobe (*Pseudomonas*, *Mycobacterium*), cianobacterii (*Nostoc, Oscillatoria, Spirulina*), levuri (*Candida, Torulopsis*), mucegaiuri (*Rhizopus, Penicillium*), alge (*Chlorella, Scenedesmus*).

Microorganismele cultivate în scopul obţinerii biomasei trebuie să aibă un randament bun de creştere (să realizeze densităţi celulare mari pe unitatea de volum), să aibă conţinut mare de proteine bogate în aminoacizi esenţiali, să nu producă substanţe toxice, să aibă gust acceptabil, sa fie uşor digestibile, să crească pe substraturi ieftine, să fie rezistente la contaminare cu alte microorganisme.

Pentru stimularea formării nodozităţilor la plantele leguminoase, în agricultură se utilizează inoculul de *Rhizobium.*

Enzimele produse de microorganisme sunt amilaze, proteaze, lipaze. Utilizarea lor industrială are avantaje multiple, comparativ cu agenţii chimici, deoarece au acţiune specifică şi sunt lipsite de toxicitate. O enzimă foarte importantă este glucozo-izomeraza, folosită pentru obţinerea fructozei (un îndulcitor) din glucoză.

Produşii de metabolism constituie cel mai important grup de substanţe, obţinute prin biotehnologii cu microorganisme. Unii sunt produşi ai metabolismului energetic fermentativ: etanol, acid lactic, acid acetic, acid butiric, acid propionic, 2,3-butan-diolul. Alţii sunt metaboliţi primari: aminoacizi (acidul glutamic, lizina, triptofanul, acidul aspartic, fenil alanina), vitamine (riboflavina, vitamina B_{12}, acidul ascorbic), acidul citric, nucleotide. Cea de a III-a categorie sunt metaboliţii secundari: antibiotice, alcaloizi (ergotina), gibereline. Aproape toate antibioticele utilizabile în clinică sunt produse prin biosinteză.

Procesele de bioconversie pe care le realizează microorganismele reprezintă o realizare biotehnologică de importanţă excepţională, deoarece astfel sunt posibile reacţii care depăşesc posibilităţile chimiei organice.

Principiul metodologiei de bioconversie este următorul: microorganismul se cultivă în fermentoare mari, pe mediul nutritiv adecvat. După ce creşterea a atins nivelul maxim, se adaugă compusul chimic ce urmează a fi convertit. După timpul de incubare necesar acţiunii microorganisului asupra substratului, din mediul de fermentaţie se purifică substanţa rezultată prin bioconversie.

Hormonii steroizi sunt foarte importanţi pentru controlul fertitilităţii la om şi animale şi a unor stări patologice (artrită, şoc), datorită efectului antiinflamator.

Unele microorganisme, în special fungii (*Aspergillus ochracaeus, Curvularia lunata, Dactylium dendroides*), dar şi bacteriile (*Streptomyces lavendulae*) transformă steroizii în corticosteroizi. Transformarea se face sub acţiunea unei enzime, într-o singură treaptă, asupra substratului, rezultând un nou compus. Pe această cale, progesterona este convertită la hidroxiprogesteronă.

Oxidarea beta-sorbitolului la L-sorboză, în procesul obţinerii vitaminei C este tot un proces de bioconversie.

În industria petrolieră, inoculul de bacterii în sonda de extracţie, prin procesele metabolice care au loc pe seama degradării hidrocarburilor din ţiţei sau a substratului energetic exogen (melasa)se eliberează CO_2 şi se sintetizează substanţe tensioactive care mobilizează ţiţeiul din depozit şI astfel se măreşte randamentul de extracţie.

În industria extractivă, bacteriile oxidează compuşii cu Fe, Ag, Cu, Ni, Mo, Zn din minereurile sărace şi astfel, metalele se extrag prin procese bacteriene. Sulful se extrage cu randament de 100%, prin oxidarea compuşilor cu sulf, de către bacteria *Thiobacillus thiooxidans.*

Microorganismele sunt utile în combaterea poluării mediului înconjurător. Eliminarea substanţelor organice din apele uzate (menajere, industriale), este consecinţa metabolizării lor, în primul rând de către bacterii.

Microorganismele se folosesc pentru valorificarea cantităţilor mari de biomasă vegetală, în scopul obţinerii etanolului sau a gazului combustibil (biogaz).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Enzime glicolitice

Microorganismele produc o varietate de enzime, majoritatea în cantităţi mici, care catalizează desfăşurarea proceselor metabolice. Unele tulpini de microorganisme produc cantităţi mari de enzime, pe care le secretă în mediu. In mediile naturale, enzimele extracelulare hidrolizează macromoleculele nutritive (proteine, amidon, pectină, celuloză, lipide, acizi nucleici), iar monomerii şi oligomerii sunt transportaţi în celulă.

Preparatele enzimatice produse de microorganisme prin procese industriale aparţin următoarelor categorii:

a) enzime hidrolitice: *glicozidaze, peptidaze* (proteaze), *lipaze*. Glicozidazele sunt oligozidaze (invertaza) şi poliozidaze (amilaze, pectinaze, celulaze);

b) oxidoreductaze (glucozidaza, catalaza);

c) izomeraze (glucoizomeraza).

Alfa-amilaza este cea mai comună enzimă amilolitică. (Amidonul este un amestec din două polizaharide: *amiloza*, o catenă lineară de resturi de glucoză, legate alfa-1,4; *amilopectina*, o moleculă ramificată formată din lanţuri de amiloză, legate prin puncte de ramificare alfa 1-6. Proporţia celor două tipuri de molecule variază în funcţie de sursă, dar amilopectina formează circa 70%). Alfa-amilaza este o endoglicozidază, ce hidrolizează legăturile interne alfa – 1,4 din amiloză, amilopectină şI din glicogen. Alfa-amilazele sunt enzime de *lichefiere* şi de *zaharificare*.

Amilazele de lichefiere hidrolizează amiloza, la oligozaharide din 5-6 resturi de glucoză şi cantităţi mici de maltoză şi glucoză. Sunt produse de *B. amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. stearothermophilus*.

Amilazele de zaharificare fac o hidroliză mai eficientă a amilozei, rezultând cantităţi mari de glucoză, maltoză, maltotrioză. Ele sunt produse de *B. subtilis*, iar pentru producţia industrială se folosesc fungii *A. oryzae, Rhizopus* sp.

Alfa-amilazele sunt metalo-enzime cu Ca şi necesită cel puţin un atom/moleculă. Ca^{2+} le conferă stabilitate la variaţii largi de pH, activitatea optimă fiind între 4,8 şi 6,5. Enzimele fungice sunt glicoproteine şi activitatea optimă este la un pH mai scăzut.

Glucoamilaza (amiloglucozidaza) hidrolizează legăturile alfa-1,4 din amilopectină, amiloză şi glicogen. (Glicogenul este o formă ramificată de amilopectină). Este o exoenzimă ce atacă legăturile de la capătul nereducător al catenei. Enzima hidrolizează mai lent şi legăturile alfa-1,6 la punctele de ramificare a amilopectinei. Face o hidroliză aproape totală a amidonului, la glucoză (circa 96%). Enzima este produsă de bacterii, dar pe cale industrială se obţine din culturi de *Aspergillus* şi *Rhizopus*.

Beta-amilaza este produsă de bacterii: *B. polymyxa, B. cereus, B. megatherium*. Este o exoenzimă ce atacă legăturile alfa-1,4 ale amilozei, de la capătul nereducător. Nu hidrolizează legăturile alfa-1,6. Produsul final al hidrolizei este o dextrină.

Amilazele sunt folosite pe scară largă în industria prelucrării amidonului, unde au înlocuit hidroliza acidă clasică.

Procesul de bază începe cu etapa obţinerii pastei de amidon. Amestecul de amidon-apă, ce conţine granule insolubile de amidon se încălzeşte la 105-110°, pentru spargerea granulelor şi eliberarea amidonului în soluţie. Sub acţiunea amilazei şi glucoamilazei, din amidon (cereale, cartof) se obţine un sirop care conţine 40% glucoză, 45% maltoză şi restul maltotrioză, utilizat în industria berii, în panificaţie, a produselor de cofetărie, a băuturilor dulci.

Prin prelucrarea amidonului se obţin siropuri de fructoză. Fructoza este de două ori mai dulce decât glucoza şi se foloseşte ca înlocuitor al sucrozei din alimente şi băuturi.

Pentru obţinerea siropului de fructoză, alfa-amilaza termostabilă, adăugată înainte şi după obţinerea pastei de amidon, scurtează lanţul polizaharidic şi reduce vâscozitatea polimerului, prin hidroliza parţială la maltodextrine de circa 40 de resturi de glucoză (faza de lichefiere).

În etapa de zaharificare, alfa-amilazele şi glucoamilaza fac o conversie aproape totală a amidonului la glucoză (circa 96%). In etapa izomerizării, glucozo-izomeraza converteşte glucoza la fructoză. Produsul final al acţiunii enzimelor este un sirop care conţine cantităţi egale de glucoză şi fructoză, ce se adaugă ca îndulcitor al băuturilor răcoritoare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Amilazele se utilizează în industria alcoolului distilat, pentru zaharificarea pastei de amidon înainte de procesul fermentativ, în panificaţie pentru ameliorarea făinii cu activitate alfa-amilazică slabă (pentru mărirea cantităţii de maltoză în timpul pregătirii aluatului), pentru clarificarea sucurilor de fructe şi a berii prin hidroliza amidonului, în industria textilă pentru îndepărtarea dextrinei depusă pe firele de bumbac pentru a-i consolida elasticitatea şi a le proteja de eroziune în timpul ţesutului.

Invertaza (zaharaza, sucraza), produsă în special de levuri, hidrolizează zaharoza la un amestec de glucoză şi fructoză. Zahărul invertit este mai solubil decât dizaharidul şi astfel, concentraţia de zahar a unui produs poate fi mărită fără să apară fenomenul de cristalizare.

Enzimele de depolimerizare sunt: *izoamilaza* (hidrolizează legăturile alfa-l,6 din glicogen); *pululanaza-* hidrolizează legăturile alfa-l,6 din pululan. (Pululanul este o moleculă lineară de unităţi de maltotrioză, legate prin punţi alfa-l,6). Aceste enzime sunt produse industrial de *K. pneumoniae* şi *B. pullulyticus*.

Proteaze

Proteazele sunt cele mai importante din punct de vedere economic, dintre toate enzimele produse pe cale industrială. Ele reprezintă circa 40% din producţia totală de enzime. Proteazele sunt produse de bacterii şi fungi, iar în ultimul timp au dobândit importanţă practică, proteazele de origine virală. Cele mai multe proteaze comerciale, mai ales neutre şi alcaline, sunt produse de g. *Bacillus*. Proteazele bacteriene neutre sunt active la pH 5-8 şi au toleranţă termică scăzută. Se caracterizează prin afinitatea lor mare pentru secvenţele de aminoacizi hidrofobi. Unele proteaze neutre sunt de tipul *metaloproteazelor*, adică necesită ioni metalici bivalenţi pentru activitatea lor şi sunt sensibile la prezenţa ionilor chelatori, iar altele sunt *serin-proteaze* şi activitatea lor nu este modificată de agenţii chelatori.

Proteazele bacteriene alcaline au activitate optimă la pH alcalin (10) şi temperatura de 60°, proprietăţi care le fac adecvate pentru industria detergenţilor.

Proteazele fungice au o diversitate mult mai mare decât cele bacteriene. De exemplu, *Aspergillus oryzae* secretă proteaze acide, neutre şi alcaline. Ele sunt active la pH 4-11, au o specificitate largă de substrat, ca şi cele bacteriene, dar rata reacţiei şi termotoleranţa sunt inferioare. Proteazele fungice neutre sunt metaloproteaze, active la pH 7 şi sunt inhibate de agenţii chelatori.

In mod curent, proteazele se clasifică pe baza a două criterii: a)tipul de reacţie catalizată; b)natura chimică a situsului catalitic.

In funcţie de situsul de acţiune, proteazele se subîmpart în două grupe: a) *exopeptidaze*; b) *endopeptidaze*.

Exopeptidazele clivează legătura peptidică proximală grupării $-NH_2$ sau –COOH terminală, iar endopeptidazele clivează legăturile peptidice interne ale moleculei proteice din substrat.

Aminopeptidazele acţionează la nivelul grupării $-NH_2$ terminale a catenei polipeptidice şi eliberează un singur aminoacid, un dipeptid sau un tripeptid. Aceste enzime sunt produse de bacterii şi fungi şi au localizare intracelulară, deşi *A. oryzae* produce o enzimă extracelulară.

Carboxipeptidazele acţionează la nivelul grupării –COOH terminale a polipeptidului şi eliberează un singur aminoacid sau un dipeptid şi se împart în trei grupe majore: *serin-, metalo- şi cistein-carboxipeptidaze.*

Endopeptidazele se caracterizează prin acţiunea lor preferenţială asupra legăturilor peptidice interne ale catenei polipeptidice. Grupările $-NH_2$ sau –COOH au influenţă negativă asupra enzimei.

In funcţie de natura restului de aminoacid la situsul activ al enzimei, endopeptidazele se împart în 4 grupe:

- *serin-proteazele* au un rest de serină la situsul activ. Au activitate optimă la pH 9-11. Sunt produse de *B. liqueniformis, B. amyloliquefaciens* şi de bacili alcalifili;

- *metalo-proteazele* sunt active la pH neutru şi conţin un atom de metal, esenţial pentru activitatea enzimei (de obicei Zn). Sunt sintetizate de *B. stearothermophilus*;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- *cistein-proteazele* au un rest de cisteină la situsul activ. Activitatea optimă este la pH acid. Sunt produse de câteva tulpini bacteriene, dar pe cale industrială se obţin din plante. Exemplul tipic este papaina;

- *aspartic-proteazele* sunt proteaze acide, cu activitate optimă la pH 3-4. Sunt produse de unele bacterii, dar sunt larg răspândite la mucegaiuri şi la levuri. Situsul lor activ are un rest aspartat.

Aplicaţii ale proteazelor

Proteazele au o varietate largă de aplicaţii, în special în industria detergenţilor şi cea alimentară, în industria mătăsii pentru îndepărtarea gelatinei sau cazeinei folosite ca material protector al fibrelor faţă de eroziunea în timpul ţesutului, dar şi în alte tehnologii.

Ecologizarea unor procese industriale impune aplicarea unor tehnologii, în care, proteazele înlocuiesc unele metode clasice, bazate pe folosirea reactivilor chimici, ca de exemplu, industria pielăriei şi procesele de bioremediere. Proteazele se folosesc pe scară largă în industria farmaceutică pentru prepararea unguentelor şi pentru curăţirea rănilor. In scop farmacologic, proteazele se obţin în stare pură, în cantităţi mici, iar pentru alte scopuri se produc în cantităţi mari şi se folosesc ca preparate brute.

Proteazele sunt ingredientele de bază ale *detergenţilor*. In acest scop se foloseşte circa 25% din producţia de enzime. Proteazele din detergenţi trebuie să aibă specificitate largă de substrat şi să fie active şi stabile la pH crescut şi temperatură ridicată.

Prelucrarea pieilor parcurge etapele de înmuiere, depilare, sămăluire (îndepărtarea materialului necolagenic – albumină, globuline) şi tăbăcire. Inmuierea, în metoda clasică, s-a făcut cu baze, iar acum se folosesc proteazele alcaline. Metoda clasică pentru depilare constă în alcalinizarea şi tratamentul cu bioxid de sulf pentru solubilizarea proteinelor rădăcinii părului. Acum se folosesc proteaze alcaline cu var şi NaCl, ceea ce reduce cantitatea de apă uzată rezultată din procesul industrial. Sămăluirea se face cu tripsină pancreatică, cu proteaze din *Bacillus, Aspergillus*.

In *industria alimentară*, proteazele se folosesc pentru obţinerea derivatelor din lapte şi în panificaţie. In industria laptelui, proteazele se folosesc ca agenţi de coagulare pentru obţinerea brânzeturilor.

In *panificaţie*, proteazele din *A. oryzae* sunt utilizate pentru proteoliza limitată a glutenului, proteina care determină proprietăţile aluatului. Tratamentul enzimatic al aluatului permite obţinerea unei palete largi de produse.

Proteazele alcaline se folosesc pentru prelucrarea făinii de soia, o sursă alimentară bogată în proteine de calitate bună.

Hidrolizatele proteice intră în compoziţia produselor dietetice, în dieta copiilor, ca agenţi amelioratori ai gustului, dar au inconvenientul major al gustului amar, a cărui intensitate este proportională cu cantitatea de aminoacizi hidrofobi pe care îi conţine şi în special, de prolină. Peptidazele produse de bacteriile lactice care clivează aminoacizii hidrofobi şi prolina se folosesc pentru îndepărtarea gustului amar al hidrolizatelor proteice.

Aspartamul se foloseşte ca îndulcitor artificial necalorigen şi este un *dipeptid* alcătuit din *acid L-aspartic* şi esterul metilic al *L-fenilalaninei*. Configuraţia L a celor doi aminoacizi îi conferă gustul dulce. Pentru obţinerea sa este preferată metoda sintezei enzimatice. Deşi proteazele sunt enzime hidrolitice, în anumite condiţii ele catalizează reacţia inversă, de formare a legăturii peptidice.

In industria farmaceutică, proteazele din *A. oryzae*, administrate oral, se folosesc pentru corectarea deficienţei unor enzime digestive. *Colagenaza* de *Clostridium* sp., în asociaţie cu diferite antibiotice, se administrează pentru tratamentul arsurilor şi rănilor. O *asparaginază* din *E. coli* se foloseşte pentru eliminarea asparaginei din sânge, în variate forme de leucemie limfocitară.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Celulaze

Hidroliza celulozei cristaline la glucoză este un deziderat de mare perspectivă, dar cu preparatele enzimatice actuale, procedeul nu este economic. Încălzirea globală a climei, datorită emisiei de CO_2, rezultat din arderea industrială a combustibililor fosili, a reînoit interesul pentru utilizarea biomasei în scopul producerii energiei. Trecerea de la combustibilii fosili, la cei derivaţi din biomasă, ar reduce emisia netă de CO_2 la valori minime.

Celuloza este polizaharidul major sintetizat de plante. Este un polimer linear format din subunităţi de glucoză, legate beta-1,4. Unitatea repetitivă a celulozei este *celobioza* (dimer de glucoză). Celuloza este insolubilă în apă. Celuloza nativă este formată din *microfibrile*, care la rândul lor conţin între 100 şi 14 000 resturi de glucoză. Microfibrilele sunt formate dintr-o alternanţă de domenii foarte ordonate, cu structură *cristalină* şi regiuni *amorfe*. Proporţia zonelor cristaline variază de la 0, în celuloza tratată cu acid şi în derivatul solubil carboximetil-celuloza (CMC), până la 100% pentru celuloza din peretele algei *Valonia*. De cele mai multe ori, fibrilele de celuloză din peretele celulei vegetale sunt incluse într-o matrice formată din *hemiceluloză* şi *lignină*. Hemiceluloza este un complex de polimeri glucidici, în care xilanii şi mananii sunt componente principale. Lignina este un polimer rezultat prin condensarea alcoolilor aromatici, rezistent la biodegradare şi protejează celuloza de atacul enzimatic al microorgnismelor.

Cea mai mare parte a celulozei se găseşte sub forma *lignocelulozei*. Procesul degradării este prea lent pentru a-şi găsi aplicabilitate industrială. Diminuarea structurii cristaline (cea mai rezistentă la atacul enzimatic) prin tratamente fizice şi chimice şi creşterea suprafeţei disponibile pentru acţiunea enzimelor, sunt căile de optimizare a procesului de degradare a celulozei. Hidroliza hemicelulozei poate fi catalizată de acidul adăugat sau de acidul acetic eliberat din grupările acetil ale xilanului.

Pe măsură ce hidroliza hemicelulozei avansează, lignina se separă de microfibrilele de celuloză.

Enzimele celulazice sintetizate de fungi (*Trichoderma reesei*) sunt amestecuri de *exoenzime* (celobiohidrolază), *endoenzime* şi *beta-glucozidază*. Exoenzima începe hidroliza fibrilei de celuloză la regiunile amorfe, urmată de hidroliza sinergică sub acţiunea endocelulazei, decisivă pentru degradarea polizaharidului. *Clostridium thermocellum* produce o endoglucanază sub forma *celulosomilor*, care hidrolizează celuloza nativă, în absenţa exoenzimelor. Derivaţii solubili ai celulozei (carboxi-metil-celuloza) sunt hidrolizaţi de diferite endocelulaze produse de bacterii, inactive faţă de celuloza nativă.

Celulazele se folosesc pentru degradarea pulpei de fructe, cu scopul creşterii randamentului de extracţie a uleiurilor şi sucurilor.

Tratarea furajelor de siloz cu enzime celulazice, eliberează glucidele şi grăbeşte fermentaţia lactică, inhibând fermentaţia butirică de către *Clostridium* şi asigură o conservare optimă.

Enzimele care degradează hemiceluloza, se folosesc pentru înălbirea pastei celulozice din care se fabrică hârtia.

Celulazele se utilizează ca aditivi ai detergenţilor de spălare. Spălarea repetată a textilelor de bumbac, duce la atenuarea culorii, datorită uzurii fibrelor. Acţiunea limitată a celulazelor adăugate la detergent, îndepărtează microfibrilele şi restabileşte culoarea originală a ţesăturii.

Lipaze

Substratul lipazelor este molecula de trigliceride cu acizi graşi cu catenă lungă. Trigliceridele fiind insolubile în apă, lipazele catalizează hidroliza legăturilor ester la interfaţa dintre faza apoasă şi substratul solid.

Lipazele se folosesc ca aditivi în detergenţii de spălare şi în industria alimentară. Lipazele microbiene se folosesc pentru modificarea grăsimilor de origine vegetală.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sub forma preparatelor polienzimatice (amilaze, proteaze, celulaze, fosfataze), se administrează la om pentru a compensa insuficienţa sucurilor digestive şi pentru a combate tulburările asociate.

Enzimele microbiene se folosesc pentru ameliorarea nutriţiei animalelor şi a omului. Ele se adaugă în hrana animalelor pentru accelerarea digestiei.

Acidul lactic

Microorganismele industriale pentru producerea acidului lactic sunt homofermentative: *Lactobacillus* sp. şi, în măsură mai mică, *Lactococcus, Streptococcus* şi *Pediococcus*. În prezenţa unei cantităţi mici de CO_2, acidul lactic este produs în condiţii de aerobioză de *Rhizopus oryzae*. Substratul fermentabil este glucoza sau fructoza, bine utilizate de lactobacili, la care se adaugă săruri minerale, extract de porumb, de levuri, făină de soia, de bumbac, diferite hidrolizate proteice. Producţia industrială a acidului lactic se face prin cultivare în cultură discontinuă. Cultivarea în regim continuu, trebuie să ţină seama de faptul că lactococii sunt adesea lizogeni. Declanşarea unui ciclu litic prin inducţia unui profag antrenează distrugerea întregii culturi, oricare ar fi tehnicile de asepsie.

Acidul citric

Acidul citric este un metabolit primar al ciclului acizilor tricarboxilici, produs al unui proces metabolic aerob. Până în anul 1923, acidul citric a fost produs numai în Italia, prin procedeul extracţiei din fructe citrice. După această dată, în SUA a început producţia microbiologică cu *Aspergillus niger*. În mod normal, acidul citric nu se acumulează în mediul de creştere.

Sursa de carbon este zaharoza (din melasa de la fabricile de zahăr sau din siropul de trestie de zahăr), iar cea de azot este NH_4NO_3, în condiţii de pH foarte acid (1,7-2,2). Dacă sursa de carbon este amidonul (din cartof), este necesară adăugarea amilazei pentru hidroliză. Conţinutul în Fe al mediului trebuie să fie minim, deoarece acidul citric este produs adaptativ pentru a lega Fe din mediu. Eliminarea Fe se face cu răşini schimbătoare de ioni sau cu ferocianura de potasiu. Acidul citric se separă prin filtrare şi se precipită cu $Ca(OH)_2$. Precipitatul se separă prin filtrare, se spală şi se tratează cu H_2SO_4. Rezultă acidul citric şi precipitatul de $CaSO_4$. Acidul citric se foloseşte în industria alimentară, farmaceutică etc.

Acidul acetic

Acidul acetic este produsul conversiei alcoolului etilic la acid acetic, de către bacteriile acetice din g. *Acetobacter* şi *Gluconobacter*. Acidul acetic alimentar se obţine din vin sau din cidru (vin de mere). Procesul conversiei este aerob şi condiţiile de aerare sunt esenţiale pentru desfăşurarea procesului. Oxidarea alcoolului etilic nu este completă, ci se opreşte la acidul acetic, care se acumulează în mediu. Bacteriile acetice sunt acido-rezistente, în condiţiile acumulării acidului acetic în mediu.

Aminoacizi

Majoritatea aminoacizilor se obţin prin sinteza chimică, dar rezultă forme DL, optic inactive. Aminoacizii, în forma L sunt produşi pe cale microbiologică. Producerea industrială a aminoacizilor este impusă de faptul că, singurele organisme care îşi sintetizează toţi aminoacizii necesari sunt plantele. Omul şi animalele au pierdut capacitatea de a face sinteza unor aminoacizi (lizina, treonina, valina, metionina, triptofanul, leucina şi izoleucina), care se numesc aminoacizi *esenţiali*. Aportul lor pentru necesităţile organismului, este exogen.

Adausul de aminoacizi măreşte valoarea nutritivă a alimentelor de origine vegetală, deficiente în conţinutul unor aminoacizi: de exemplu, făina de porumb nu conţine lizină şi triptofan).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pe cale microbiologică, se sintetizează în special acidul glutamic (produs de *Corynebacterium glutamicum*), lizina (cu *Brevibacterium flavum*), acidul gluconic (folosit în farmaceutică sub forma gluconatului de Ca, pentru corectarea deficitului de Ca), acidul aspartic şi fenilalanina (utilizaţi ca ingredienţi ai îndulcitorului *aspartam*, pentru producerea băuturilor răcoritoare).

Prima treaptă enzimatică a biosintezei aminoacizilor este supusă inhibiţiei feed-back prin produsul final al căii. In bioindustrie se folosesc mutante bacteriene, la care, prima enzimă a căii nu mai este sensibilă la inhibiţia prin feed-back. In general, metaboliţii esenţiali, aşa cum sunt aminoacizii nu sunt excretaţi. Pentru a evita inhibiţia prin feed-back, este necesară o mutantă care să excrete aminoacizii în mediu.

Vitamine

Majoritatea vitaminelor se obţin prin sinteză chimică. Cele care au o structura chimică prea complexă pentru a fi sintetizate pe cale chimică, sunt produse de microorganisme.

Vitamina B_{12} (ciancobalamina), în natură, este sintetizată exclusiv de către unele microorganisme (*Propionibacterium, Pseudomonas denitrificans).* Necesarul alimentar pentru această vitamină este satisfăcut prin ingestia hranei sau prin absorbţia vitaminei produsă de microbiota intestinală. Omul trebuie să obţină vitamina B_{12} din hrană, sau să-i fie administrată ca supliment vitaminic, pentru că, deşi este sintetizată de microbiota intestinală, nu este absorbită în sânge. Enzima conţine Co în structura sa şi randamentul sintezei sale creşte prin adăugarea Co la mediul de creştere.

Vitamina B_2 (riboflavina) este sintetizată de bacterii, levuri şi fungi (*Ashbya gossypii*), pe un mediu cu hidrolizat de porumb. Enzima se sintetizează şi pe cale chimică.

Utilizarea levurilor în microbiologia industrială

Levurile sunt cele mai importante microorganisme industriale, deoarece au cea mai largă utilizare. Ele se cultivă pentru obţinerea *biomasei* (folosită în industria panificaţiei şi ca adaus alimentar).

Din levuri se prepară extractul de levuri, un ingredient esenţial al multor medii nutritive pentru microorganisme, *vitamine* (complexul B, D), precum şi *enzime* pentru industria alimentară (invertaza, galactozidaza).

Cu levurile se obţin produse de fermentaţie: alcool etilic, glicerol, bere, vin dar şi băuturi alcoolice distilate (whisky, brandy, vodcă, rom).

Fermentaţia alcoolică

Fermentaţia alcoolică este una din cele mai importante fermentaţii industriale, deoarece alcoolul se întrebuinţează în industria alimentară, chimică, farmaceutică, a parfumurilor şi a cauciucului.

Materiile prime folosite pentru producerea fermentativă a alcoolului sunt reprezentate de: materii prime *amidonoase* (cartof, porumb, orz, secară, grâu etc.), utilizabile după conversia hidrolitică a amidonului, în zaharuri simple fermentescibile de către levuri; materii prime *zaharoase* (trestie de zahăr, sfecla de zahăr, sucuri de fructe, melase (deşeuri de la fabricarea zahărului) şi leşii sulfitice (soluţii reziduale de la fierberea lemnului utilizat la fabricarea hârtiei, ce conţine 1-25% zahăr); materii prime *celulozice* (lemn şi stuf), care prin fierbere cu acizi sub presiune, se hidrolizează şi eliberează glucide simple, fermentescibile.

Levurile nu produc amilaze sau celulaze. De aceea, înainte de utilizarea lor în fermentaţiile industriale, materiile prime amidonoase şi celulozice sau hemicelulozice trebuie hidrolizate sau convertite la glucide simple fermentescibile. Hidroliza se realizează cu preparate *enzimatice* de origine vegetală (malţul[x] de cereale), cu *enzime* produse de

[x] Malţul este un produs enzimatic preparat de obicei din orz de bună calitate, selecţionat pentru capacitatea de germinare de minimum 95% şi o mare putere de germinare. În timpul germinării, în bobul de orz încolţit se produc multe modificări biochimice. Esenţială este formarea unei cantităţi mari de enzime sau activarea celor existente. Înainte de a fi utilizat pentru hidroliza materiei amidonoase, malţul, care nu se poate păstra în stare proaspătă, este uscat şi măcinat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

microorganisme (amilaza din *Aspergillus oryzae*) sau prin hidroliză acidă (cu HCl sau H_2SO_4 diluaţi). Zaharificarea cu acizi are avantajul că permite sterilizarea soluţiei zaharoase, dar reduce randamentul producţiei de alcool şi scade valoarea nutritivă a borhotului rămas după fermentaţie.

a. Obţinerea alcoolului etilic din cartofi şi cereale

Materia primă amidonoasă este tratată în prealabil, pentru a deveni un mediu favorabil multiplicării levurilor, adică să conţină zaharuri simple, fermentescibile. In acest scop, ea este supusă unui proces de fierbere sub presiune (o oră la 2,5-3 atmosfere), urmată de decompresarea bruscă. Celulele se sparg, iar granulele de amidon se dezagregă, transfor-mându-se într-un terci (clei de cocă) de amidon. Amidonul este supus în prealabil, unui proces de zaharificare cu malţ.

Pentru zaharificare, masa de amidon este tratată timp de 90 de minute, la 60-62°, cu malţ măcinat şi amestecat cu apă. Amilaza din malţ hidrolizează amidonul şi se formează maltoza (25-30% din plămadă) şi dextrine. Plămada dulce este un mediu adecvat pentru creşterea levurilor (*Saccharomyces*), care realizează fermentaţia alcoolică.

Fermentaţia alcoolică poate fi spontană – sub acţiunea levurilor "sălbatice", prezente în sol şi contaminante ale materiei prime – sau dirijată, prin introducerea în materialul de fermentat, a unor culturi de levuri selecţionate din grupul celor de fermentaţie superioară*.

Fermentaţia alcoolică durează 72 de ore şi are trei faze succesive: a) faza *preliminară* – de fermentaţie lentă, cu o durată de circa 20 de ore la 28°, caracterizată prin degajarea slabă a CO_2 şi care corespunde perioadei de multiplicare a levurii; b) faza *principală* de fermentaţie, cu o durată de circa 18 ore, în care multiplicarea levurii încetează, dar fermentaţia are o rată maximă, însoţită de o degajare intensă de CO_2 şi formarea unui strat de spumă; c) faza de *fermentaţie* complementară, cu degajare lentă de CO_2, care la 28° durează 24-30 de ore.

Produsul rezultat conţine alcool, în concentraţie de 10-12% şi diferiţi produşi secundari (acetaldehida, glicerina, acizi organici volatili şi alcooli superiori, care-i conferă gust şi miros neplăcut). Prin distilarea lui se obţine spirtul brut (concentraţie în alcool etilic de 75-85%) şi borhotul (reziduul după distilare). Alcoolul brut conţine nu numai alcool etilic, dar şi o cantitate mică de glicerol – denumit *ulei de fuzel.*

Pentru eliminarea acestor impurităţi, alcoolul este supus rafinării sau rectificării prin distilare fracţionată. Uleiul de fuzel care se separă prin distilarea ultimei porţiuni din distilatul de rafinare, este format dintr-un amestec de alcooli amilic, izoamilic, propilic şi butilic, acizi acetic şi butiric, diferiţi esteri etc. El este folosit în industria chimică, ca materie primă pentru prepararea solvenţilor necesari în industria lacurilor şi în prepararea unor esenţe alimentare.

Fermentaţia alcoolică are numeroase aplicaţii practice în industrie, fiind utilizată în producţia spirtului şi a băuturilor spirtoase, la producerea vinului, a berii, a sucurilor de fructe şi în panificaţie.

Băuturile alcoolice naturale se prepară prin distilarea produselor rezultate în urma fermentaţiei alcoolice a diferitelor fructe (prune, mere, cireşe, vişine, piersici, dude etc.). Fermentaţia este făcută de levurile naturale de pe fructe sau de tulpini selecţionate. Produsul rezultat din fermentaţie, este concentrat prin distilare şi redistilare, până la un conţinut de 40-50% alcool. În cursul fermentaţiei, pe lângă alcool se formează şi alţi alcooli şi esteri, în proporţii variabile, după cantitatea de aminoacizi din materia primă, care dau băuturilor, aroma şi "buchetul" caracteristice.

---

* Levurile de fermentaţie superioară se ridică la suprafaţa substratului în timpul procesului fermentativ. Spuma are aspect mat. Depozitul celular este puţin aderent şi la o agitare uşoară, se resuspendă. Temperatura optimă de dezvoltare este de 25—30°. Fermentează numai 1/3 din molecula de rafinază (trizaharid format din Gal-Glu-Fru). Aceste levuri au numai invertază, care metabolizează molecula de fructoză, iar melibioza rămâne nehidrolizată. Suportă concentraţii mari de etanol în mediu (17-18%): *S. cerevisiae, S. cerevisiae* var. *ellipsoideus.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

b. *Utilizarea levurilor în vinificaţie*

Vinul este o băutură alcoolică nedistilată, obţinută prin fermentaţia mustului de struguri. Mustul de struguri este un produs cu compoziţie chimică foarte complexă şi variabilă: conţine 18-25% zahăr (glucoză, levuloză, zaharoză, pentoze, pentozani), 0,3-1,5% acizi (tartric, malic, citric, oxalic, gluconic, glucuronic etc.), aminoacizi, taninuri, vitamine, pigmenţi, substanţe minerale etc.

Fermentaţia mustului, obţinut prin spargerea strugurilor recoltaţi la maturitate, se face în recipiente speciale deschise. Levurile folosite în fermentaţia mustului sunt de două feluri: a) levuri sălbatice, prezente în mod natural pe tegumentul boabelor de struguri (*S. ellipsoideus*); b) levuri cultivate şi selecţionate, care se adaugă la mustul de struguri pentru a începe fermentaţia.

O diferenţă majoră între levura sălbatică şi cea cultivată este toleranţa la alcool. Majoritatea levurilor sălbatice pot tolera numai o concentraţie de 4% alcool, după care activitatea lor fermentativă încetează. Levurile selecţionate pot tolera până la 12-14% alcool.

De multe ori este posibilă obţinerea unui vin de calitate, prin fermentaţia produsă de levurile sălbatice existente pe bobul de strugure. De cele mai multe ori, levurile sălbatice, pe lângă conţinutul alcoolic scăzut, nu conferă nici aroma produsului final. De aceea, prezenţa levurilor sălbatice în procesul fermentativ nu este de dorit. Ele se îndepărtează prin adăugarea SO_2 (100 ppm) la mustul de strugure. Mustul se însămânţează cu "starteri" de fermentaţie, reprezentaţi de o cultură pură, crescută pe suc de strugure sterilizat sau pasteurizat.

Fermentaţia parcurge trei faze succesive: a)faza de *multiplicare* a levurii, în cursul căreia au loc creşterea şi multiplicarea pe seama O_2 dizolvat în must; b)etapa *fermentaţiei* zgomotoase începe după ce O_2 a fost consumat în faza multiplicării şi s-au creat astfel condiţii de anaerobioză. Se degajă caldură, care poate să urce temperatura, peste nivelul optim fiziologic al levurii. De aceea, temperatura trebuie controlată şi ţinută sub 29°. Cele mai fine vinuri se obţin printr-o fermentaţie la 21-24°; c)faza de *fermentaţie finală*, de mică intensitate.

Fermentorul trebuie construit astfel încât să permită degajarea cantităţii mari de CO_2, dar să împiedice pătrunderea aerului.

În cursul fermentaţiei, concentraţia zahărului scade, dar creşte concentraţia de alcool. Se formează o serie de produşi secundari de fermentaţie: glicerina, acetaldehida, acizi (lactic, acetic, succinic, citric), alcooli superiori (izoamilic, izobutilic etc.) şi diferiţi esteri. Vinul astfel obţinut, poate fi "sec", când toată cantitatea de zahăr din must a fost fermentată, sau "dulce", atunci când fermentaţia nu este dusă până la capăt. Vinul conţine o parte din zahărul iniţial, sau zahărul adăugat suplimentar, care se simte la gust.

După încheierea procesului de fermentaţie, vinul se separă de sedimentul format din celulele levurii şi din substanţe organice precipitate. Vinul se depozitează pentru *maturare*, dobândirea aromei şi clarificare. Clarificarea (limpezirea) poate fi grabită prin adăugarea taninurilor, bentonitei sau se filtrează prin pământ de diatomee, azbest sau membrane filtrante.

În procesul maturării, au loc oxidări, reduceri, esterificări, pe durata câtorva luni, până la doi ani. In acest timp, celulele de levură se lizează, ceea ce stimulează dezvoltarea lactobacililor. Aceştia atenuează asprimea, prin diminuarea acidităţii, ca urmare a transformării acidului malic în acid lactic şi fac să dispară gustul de levură. In această fază, "buchetul" se ameliorează prin esterificarea alcoolilor superiori şi a unei părţi din alcoolul etilic, cu diferiţi acizi existenţi, iar culoarea vinului se modifică.

c. *Utilizarea levurilor în industria berii*

Berea este o băutură alcoolică nedistilată, obţinută prin fermentarea mustului de malţ de orz, cu un conţinut redus de alcool, dextrină, maltoză, peptone şi aminoacizi, care îi conferă şi o valoare nutritivă.

Denumirea provine de la cuvântul latinesc *baere*, care înseamnă orz. Producerea berii cuprinde trei etape principale: a) prepararea malţului; b) producerea mustului; c) fermentaţia.

Materia primă – bobul de orz – conţine polizaharide care devin accesibile echipamentului enzimatic al levurii, numai după o degradare prealabilă la molecule mici. De

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

aceea, *prepararea malţului* sau *maltajul,* are ca scop activarea enzimelor din bobul de orz, care produc hidroliza amidonului (etapa de zaharificare). In acest scop, boabele de orz sunt mai întâi înmuiate de apă timp de două zile şi apoi puse la germinat la temperatura de 10-15°, fie în strat subţire pe o suprafaţă netedă, fie în dispozitive speciale care asigură aerarea şi întoarcerea lor periodică, pentru a preveni alterarea. In acest timp, boabele germinează, proces însoţit de acumularea enzimelor amilolitice şi proteolitice şi de o dezagregare parţiala a celulelor, care face bobul friabil şi uşor de broiat. Produsul obţinut după 6-9 zile (malţul verde) se usucă la cald. Embrionul plantei este omorât, dar enzimele rămân active. Uscarea malţului se face 10 ore la 85° pentru berea blondă, sau 36 de ore la 90-100° (malţul "brun" caramelizat), în care o parte din enzime au fost inactivate. Rădăcinile plantulei sunt îndepărtate, deoarece conferă gust neplăcut, iar boabele sunt sfărâmate prin măcinare. Rezultă malţul uscat.

Prepararea mustului sau *brasajul* are ca scop obţinerea plămezii zaharificate, care serveşte ca mediu de cultivare pentru levura fermentativă. Apa caldă extrage din malţ, diferite molecule solubile: glucide, coloranţi, tanin, iar enzimele hidrolitice degradează macromoleculele şi rezultă glucide simple, peptide, aminoacizi care trec în soluţie. Când zaharificarea este completă, produsul se filtrează pentru îndepărtarea borhotului, iar mediului steril i se adaugă 200-300 g/hl hamei (*Humulus lupulus*). Hameiul aduce în mustul de malţ, *lupulina*, un complex de substanţe secretate la baza bracteelor inflorescenţei femele sau a conurilor, care dau berei gustul amar caracteristic, aroma specială şi o uşoară putere antiseptică. După fierbere timp de 2,5 ore, care asigură sterilizarea şi clarificarea lichidului, mustul răcit brusc, este gata pentru fermentaţie.

Fermentaţia începe după însmânţarea mustului de malţ cu o tulpină de *S. cerevisiae* sau *S. carlsbergensis.* Prima este de fermentaţie superioară, iar cea de a II-a, de fermentaţie inferioară*. Pentru producerea berii tari (în Marea Britanie) se foloseşte levura de fermentaţie superioară. Cele de fermentaţie inferioară se folosesc pentru obţinerea berii cu concentraţie mică de alcool.

Faza principală a fermentaţiei are loc în bazine deschise, în prezenţa aerului, la temperatura de 6-12° şi durează 6-10 zile. Faza *secundară* a fermentaţiei se realizează în atmosfera de CO_2, la temperatura de 1-3°, după decantarea lichidului în vase închise. Masa celulară care rămâne după decantare, este folosită pentru însămânţarea unui alt lot de must, pentru extragerea de vitamine sau pentru prepararea autolizatului de levură (utilizabil la prepararea unor medii nutritive). Supernatantul care va fermenta lent, timp de 2-6 luni în tancuri de fermentaţie are puţine celule de levură. In această ultimă fază, producerea de alcool este foarte slabă, dar lichidul de fermentaţie se saturează cu CO_2 care rămâne dizolvat în cantitate mare, îşi ameliorează calităţile de gust şi aromă şi se limpezeşte prin sedimentarea resturilor de levură, a substanţelor insolubile, a răşinilor etc. Inainte de comercializare, berea este limpezită prin filtrare, la nevoie este îmbogăţită artificial cu CO_2 şi, în unele fabrici, chiar pasteurizată.

d. *Utilizarea levurilor în panificaţie*

Producerea levurii de panificaţie. In tehnologia panificaţiei, dospirea aluatului înainte de coacere este o etapă esenţială. In acest scop, mult timp s-a folosit levura de la fabricile de bere. Astăzi, levura de brutărie este produsă special. Levura se cultivă în fermentoare de mare capacitate, aerate, pe mediul reprezentat de melasa de la fabricile de zahăr. Melasa conţine zaharoză, aminoacizi, vitamine, substanţe minerale. Se adaugă acid fosforic ca sursă de P şi sulfat de amoniu ca sursă de N şi S.

Producerea biomasei de levură pentru panificaţie este un proces aerob. Menţinerea condiţiilor de aerare este esenţială. Creşterea masei celulare a levurii are loc numai în condiţiile unui metabolism aerob. In anaerobioză, creşterea ei încetează şi începe fermentaţia alcoolică. In scopul asigurării desfăşurării metabolismului aerob, cantitatea de melasă se adaugă treptat, după o rată exponenţială, corespunzatoare ratei de creştere a levurii.

** Levurile de profunzime (*S. carlsbergensis*), în timpul fermentaţiei nu se ridică la suprafaţă şi formează o spumă cu aspect sticlos. Depozitul format este aderent şi se resuspendă greu. Temperatura optimă de dezvoltare este de 5-10°. Aceste levuri fermentează total molecula de rafinoză, deoarece au atât invertază cât şi melibiază. Sporulează greu sau de loc. Sunt mai rare în mediile naturale şi se folosesc la obţinerea berii *(S. carlsbergensis).*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La sfârșitul perioadei de creștere, celulele de levură se separă de bulionul de creștere, prin centrifugare. Depozitul celular se spală cu apă și se recentrifughează. Rezultă un depozit celular de culoare deschisă, care se prelucrează prin presare în *cuburi* sau ca *pulbere uscată*.

Levura compresată se obține prin amestecul levurii centrifugate, cu agenți de emulsificare, amidon și alți aditivi, care conferă produsului o consistență adecvată. Un cub de levură conține circa 70% apă și circa 2 x 10^{10} celule/gram. Levura presată poate fi conservată prin congelare, deoarece își păstrează viabilitatea.

Levura prelucrată prin uscare, păstrează o proporție mai mică de celule viabile, comparativ cu levura presată. După spălare, levura se amestecă cu aditivi și se usucă în vid la 25-45°, timp de 6 ore, până când umiditatea diminuă la 8%. Se păstrează în containere închise ermetic, chiar în atmosferă de azot.

Fermentația alcoolică produsă de levuri este esențială pentru tehnologia panificației. Prin acțiunea enzimelor, ele fermentează zahărul din făină, cu formare de alcool și degajarea CO_2. Aluatul devine astfel bine afânat, este "crescut" (are volum mai mare). Pâinea "crescută" are miezul elastic, cu pori deși și uniformi. Are gust și aromă plăcute, datorită produșilor secundari rezultați din fermentație.

Inaintea fermentației alcoolice produsă de levuri, în aluat începe o fermentație lactică sub acțiunea bacteriilor lactice. Acidul lactic nu are rol direct în panificație, dar este foarte importantă, deoarece creează condiții de pH favorabile dezvoltării levurilor și totodată împiedică multiplicarea microorganismelor dăunătoare, care ar putea altera gustul și aroma pâinii și ar putea intra în competiție cu levurile. In același timp, fermentația lactică influențează gustul pâinii și provoacă umflarea glutenului sub acțiunea CO_2 degajat, care astfel este reținut în porii aluatului.

Activitatea micoorganismelor intervine în diferite faze ale procesului de panificație:

a) prima fază este *prepararea aluatului* – o pastă subțire obținută din amestecul unei cantități mici de făină, apă și levură. Aluatul se lasă în repaus câtva timp, pentru multiplicarea levurilor și a bacteriilor lactice, după care i se adaugă restul de făină și apă și se frământă. In cursul acestei faze, principalele proteine din făină, gliadina și glutenina formează cu apa, o masă legată, elastică numită *gluten*. Frământarea asigură omogenizarea și aerarea aluatului, fapt ce favorizează creșterea levurilor;

b) faza a II-a este *dospirea aluatului* (un proces fermentativ) și are loc la temperatura de circa 30°. Enzimele amilolitice din făină, hidrolizează o parte din amidon, până la maltoză. Sub acțiunea maltazei, maltoza este hidrolizată la glucoza. Glucoza este fermentată la alcool etilic și CO_2. In acest timp continuă și fermentația lactică, cu formare de CO_2. Sub acțiunea CO_2, glutenul elastic se umflă și astfel pâinea crește și devine poroasă;

c) în faza inițială a *coacerii*, procesele metabolice ale bacteriilor lactice și ale levurilor continuă. Până la 45-50°, levurile au activitate intensă, prin care realizează un proces fermentativ, însoțit de creșterea aluatului. Peste 50°, levurile mor, dar acțiunea enzimelor amilolitice continuă până la 80°, cu formare de CO_2, ceea ce mărește porozitatea pâinii.

In cursul acestor procese, în pâine se formează produși chimici noi, ca diacetilul, care îi conferă aroma placută.

Levurile metabolizează glucidele simple (glucoza, fructoza, melibioza și maltoza) prezente în făină, în timp ce enzimele diastatice din făină acționează asupra amidonului, mărind cantitatea de zahăr fermentescibil. Cea mai mare parte a alcoolului format se elimină în timpul coacerii pâinii, iar CO_2 este aproape în întregime reținut, datorită proprietăților de structură fizico-chimică a aluatului.

Biosinteza substanțelor antibiotice

Biosinteza substanțelor antibiotice de către microorganisme are loc printr-o serie de reacții, supradăugate reacțiilor metabolice esențiale. Antibioticele sunt *metaboliți secundari* și multe dintre ele se sintetizează când fosfatul devine factor limitant al creșterii.

Fiecare microorganism producător, ca și fiecare antibiotic au caracteristici proprii și, în consecință, tehnica producerii industriale este adaptată acestor particularități.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Biosinteza penicilinei

Microorganismul producător este o tulpină de *Penicillium chrysogenum*, înalt producătoare, selectionată prin mutageneză.

Faza inițială ("de fermentație") este cea în care se asigură cultivarea și creșterea în condiții optime a microorganismului producător. Cultivarea se face în tancuri de mare capacitate (100 000 l), prevăzute cu dispozitive de aerare cu aer steril, de agitare și de reglare a temperaturii.

Mediul de cultivare conține lactoză (ca sursă de C), făină de rapiță (sursă de azot), săruri minerale (sulfat de sodiu, sulfat de amoniu, carbonat de calciu, monofosfat de potasiu etc.). La nevoie se adaugă, în condiții de sterilitate, o substanță tensioactivă, care stimulează dezvoltarea mucegaiului prin dispersarea culturii și mărirea gradului de aerare și un agent antispumant, care oprește formarea spumei datorită agitării, aerării și agentului tensioactiv.

Microorganismul producător sintetizează, în mod obișnuit, mai multe tipuri de penicilină, cu aceiași structură de bază, dar care diferă după natura catenei laterale legată de acest nucleu.

Deoarece separarea penicilinelor prin purificare este un proces dificil, în mediul de creștere se adaugă molecule precursoare ale catenei laterale, care asigură sinteza unui anumit tip de penicilină, inhibând sinteza celorlalte tipuri. Pentru penicilina G, molecula precursoare a catenei laterale este acidul fenil-acetic ($C_6H_5CH_2$) sau unul din derivații săi (fenilacetatul de Na sau fenilacetamida). Acidul fenil-acetic rezultă și prin transformarea fenil-etilenaminei din extractul de porumb, în acidul fenilacetic.

Dintre penicilinele naturale, numai penicilina G (benzil-penicilina) este utilizabilă în clinică.

Dacă procesul fermentativ se desfășoară fără adăugarea precursorilor catenei laterale (R) se sintetizează peniciline naturale.

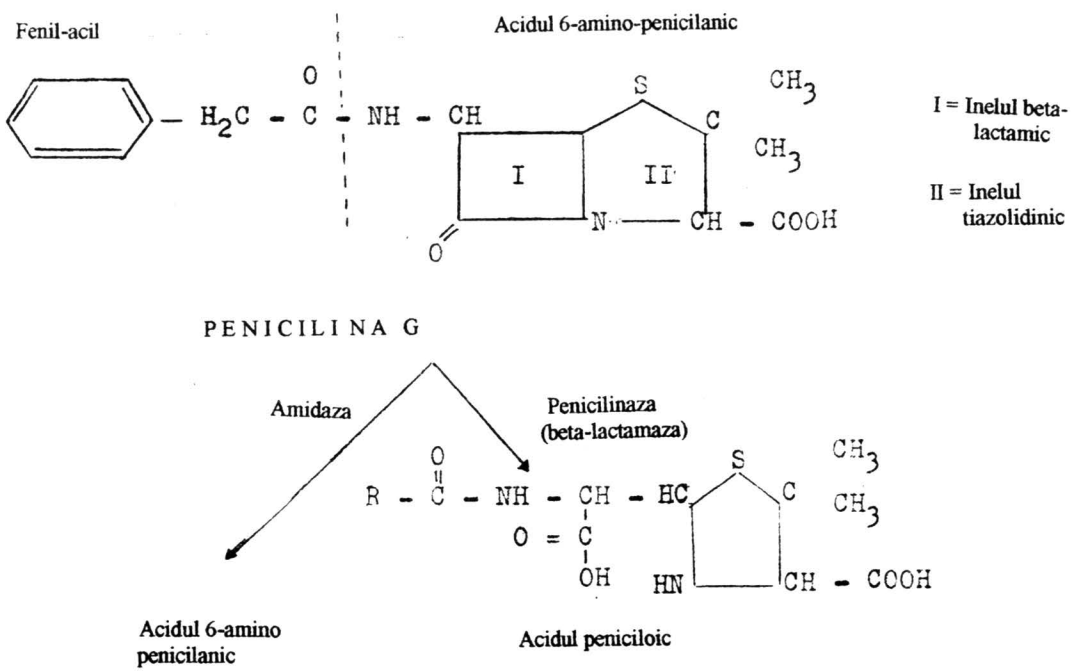


Fig. 234. Structura moleculară a penicilinei G. După clivajul enzimatic se formează acidul 6-aminopenicilanic și acidul peniciloic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Sursa de carbon a mediului este glucoza şi lactoza, iar sursa de azot şi de factori de creştere este hidrolizatul de porumb. Glucoza are dezavantajul metabolizării rapide şi al efectului de represie prin catabolit. De aceea trebuie adăugată treptat. Lactoza se metabolizează lent şi nu produce fenomenul represiei prin catabolit.

Faza "fermentativă" durează circa 120 de ore la 25° şi cuprinde trei etape: a) *etapa iniţială*, în care are loc creşterea microorganismului producător, pe seama metabolizării glucozei. Producerea de antibiotic este nesemnificativă; b) *etapa de maturaţie*, după epuizarea sursei de carbon, cu sinteza masivă de antibiotic; c) *etapa de declin* sau de îmbătrânire, în cursul căreia producerea de antibiotic este nulă şi survine chiar scăderea cantităţii sale prin degradare.

Procesul producţiei de antibiotic, strict aerob este urmărit prin controlul modificărilor biochimice (pH, concentraţia lactozei şi a NH_3), caracteristicile microbiologice (aspectul şi gradul de dezvoltare a miceliului) şi a concentraţiei de antibiotic în mediul de cultură. Procesul este submers, necesită o aerare eficientă şi este oprit în momentul în care lactoza din mediu este pe cale de dispariţie. In absenţa sursei de carbon, creşterea miceliului încetează şi survine autoliza. NH_3 alcalinizează mediul şi la pH alcalin, penicilina este instabilaă.

Penicilina se transferă în mediu. Sub 1% rămâne asociată cu miceliul fungic. Miceliul se îndepărtează prin filtrare.

Extracţia antibioticului. Lichidul obţinut la sfârşitul primei faze este vâscos, cu miros puternic şi conţine substanţe toxice, compuşi piretogeni şi numeroase impurităţi, care depăşesc de sute de ori cantitatea de antibiotic. Extracţia antibioticului din mediu se face cu solvenţi organici (pentru penicilina, cu acetat de amil sau acetat de butil la pH = 2,5). Cele insolubile (tetraciclina) se separă şi se solubilizează în solvenţi speciali sau separarea unora (streptomicina, neomicina) se face cu ajutorul răşinilor schimbătoare de ioni.

Antibioticul separat din supernatantul de creştere este supus unui proces de purificare, sterilizare, spălare, cristalizare şi uscare în vid. Dacă după controalele finale, chimice, microbiologice şi toxicologice (pentru absenţa toxicităţii şi a substanţelor piretogene) îndeplineşte condiţiile de utilizare, antibioticul este standardizat în raport cu o unitate de activitate stabilită prin convenţie internaţională şi este trecut în faza ultimă, cea de *condiţionare* (repartizare în fiole, flacoane etc,) sub forma de pulberi cristaline (prin sublimarea în vid a soluţiilor) sau încorporat în diferite substanţe. Penicilina se prezintă ca o pulbere albă, microcristalină, hidrosolubilă şi netoxică pentru om, chiar în doze mult mai mari decât cele active faţă de microorganisme.

S-au produs peste 100 de peniciline de biosinteză. Pentru obţinerea celor mai utile peniciline se foloseşte procedeul combinat, *fermentativ şi chimic*, prin care rezultă peniciline *semisintetice*.

Substratul iniţial este totdeauna penicilina G, care furnizează nucleul de acid 6-aminopenicilanic, după clivare chimică sau enzimatică. Acidul 6-aminopenicilanic rezultat se cuplează cu o catenă laterală. Astfel se obţine propicilina, meticilina, oxacilina, ampicilina, carbenicilina.

Metodele de ameliorare a producţiei de antibiotice

Producţia de antibiotice se găseşte în impas, datorită fenomenelor de rezistenţă multiplă, întâlnite frecvent la bacterii. Din această cauză se preconizează obţinerea unor *antibiotice noi* prin tehnica *fuziunii de protoplaşti bacterieni sau fungici*. Cele două tulpini celulare (bacteriene, respectiv fungice) supuse procedeului fuziunii, trebuie să facă sinteza a două antibiotice diferite, din aceiaşi familie. Prin cuplarea artificială a celor două căi de biosinteză poate să rezulte un nou antibiotic (un antibiotic hibrid).

Fuziunea protoplaştilor se poate utiliza în scopul *creşterii randamentului producţiei de antibiotice*. Se procedează la fuzionarea protoplaştilor unei tulpini bacteriene înalt producătoare, care creşte încet sau este foarte pretenţioasă la condiţiile de creştere, cu o linie bacteriană care face sinteza antibioticelor cu o rată inferioară, dar se dezvoltă repede şi nu are exigenţe nutritive deosebite. Prin fuziune rezultă organisme care cumulează proprietăţi noi, convenabile atât în ceea ce priveşte producţia de antibiotice, cât şi exigenţele nutritive.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O altă modalitate de creştere a ratei de sinteză a antibioticelor este *amplificarea genică*. Numărul plasmidelor per celulă este variabil în funcţie de tipul de control pe care celula îl exercită: un control riguros are ca efect existenţa unui număr mic de plasmide în celula (1-5 copii); un control relaxat permite creşterea numărului de copii plasmidiale per celulă (50-10). In aceste condiţii, dacă genele cdificatoare ale sintezei antibioticului sunt plasmidiale, randamentul sintezei este foarte crescut.

Transferul genelor codificatoare ale sintezei unui antibiotic, prin tehnologia ADN recombinant pare a nu fi realizabil, deoarece genele sunt dispersate. De aceea, s-a recurs la un artificiu: se încearcă mărirea producţiei de antibiotic prin grefarea unor gene promotor foarte eficiente, care să grăbească intrarea în acţiune a operonului respectiv.

O altă cale pentru ameliorarea producerii de antibiotice este biosinteza mutaţională sau *mutasinteza*. Principiul metodologic este următorul: sinteza unui antibiotic se desfăşoară pornind de la un produs iniţial, prin etape intermediare, până la sinteza produsului final. In această tehnologie se folosesc microorganisme mutante, cu incapacitatea de a face sinteza unui produs, aproape de capătul lanţului de sinteză. Dacă în mediul de creştere se adaugă compusul natural, microorganismul produce antibioticul natural. Dacă în mediul de creştere se adaugă un alt compus, nenatural (de sinteza chimică), celulele încorporează acest produs chimic nou şi sinteza este orientată în funcţie de natura produsului care a fost furnizat. Această tehnică s-a denumit *biosinteza mutaţională*.

Pentru producerea antibioticelor noi, industria de biosinteză a utilizat două căi majore:

- prin procedee de *mutageneză* s-a urmărit selecţia unor tulpini înalt producătoare. Pe această cale, randamentul biosintezei de antibiotice s-a ameliorat permanent. Procedeul este foarte laborios, deoarece mutageneza este o metoda oarbă, ce presupune testarea a mii şi mii de tulpini celulare, după iradiere cu raze UV, X sau după tratamentul cu substanţe chimice mutagene (azotiperita). Această metodă este tipică pentru producerea penicilinei, cu tulpini mutante de *P. chrysogenum*. Randamentul tulpinilor actuale, obţinute prin mutageneză cu radiaţii gama (Co^{60}) este de mii de ori superior faţă de al tulpinii originale;
- producerea de antibiotice cu un oarecare grad de modificare chimică, prin procedeul *semisintezei*. Metoda constă în grefarea unui radical chimic, pe o moleculă de antibiotic, produsă pe o cale naturală.

Bioconversia steroizilor

Corticosteroizii sunt agenţi antiinflamatori, cu o largă utilizare terapeutică. Extragerea hormonilor corticosteroizi din glandele suprarenale este foarte costisitoare, datorită dificultăţilor de procurare a acestora şi a randamentului mic de extracţie. Sinteza chimică a acestor hormoni este deasemenea laborioasă şi costisitoare. Sinteza cortizonului din acid dezoxicolic necesită 36 de etape tehnologice, randamentul este foarte mic (1-2‰), iar materia primă (secreţia biliară) este greu de procurat în cantităţile necesare.

Transformarea steroizilor în cortizon, pe cale chimică este condiţionată de introducerea unui atom de oxigen în pozitia C_{11}, a unui nucleu steroidic natural. Prezenţa atomului de oxigen în această poziţie, conferă efectul antiinflamator al hormonilor corticosteroizi. Această oxidare este realizată de mucegaiul *Rhizopus arrhizus*.

Substratul acţiunii mucegaiului este nucleul steroidic al progesteronei (la poziţia 11 alfa), o substanţă mai apropiată ca structură chimică de cortizon, decât acidul dezoxicolic şi care este obţinută din steroizii vegetali. (Steroizii vegetali sau sapogeninele se găsesc sub forma de glicozide denumite *saponine*, în cantităţi mari şi uşor de obţinut în plante ca *Agave, Dioscorea, Lilium, Yucca* etc.).

Randamentul este de 90%, iar produsul final se obţine după încă 11 trepte chimice (în loc de 36, câte erau necesare iniţial).

Pornind de la molecule intermediare naturale se poate ajunge pe o cale de sinteză mult simplificată, la obţinerea unui număr de steroizi noi, analogi chimic, dar cu activităţi hormonale şi biologice mai mari sau diferite.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Alte microorganisme fac hidroxilări, hidrogenări şi dehidrogenări în diferite poziţii ale inelului steroidic, ceea ce a simplificat etapele chimice de obţinere a produsului final.

Bioconversia steroizilor se realizează în tancuri de mare capacitate pentru culturi în profunzime, cu aerare şi agitare continuă. Din punct de vedere chimic şi biologic, procesul este fundamental diferit de acela al obţinerii antibioticelor, vitaminelor etc. Antibioticele şi vitaminele se sintetizează pornind de la compuşii din mediu care servesc în acelaşi timp ca substrat pentru creşterea şi multiplicarea celulelor. Dimpotrivă, substanţele steroidice sunt adăugate spre sfârşitul fazei de creştere şi suferă numai câteva modificări chimice, mici dar foarte importante, fiind determinante pentru particularităţile farmacologice ale substanţelor astfel obţinute. Când transformarea substratului steroidic este completă, miceliul este îndepărtat, iar filtratul este tratat cu un solvent al steroizilor (cloroform, tricloretilena), separându-se până la 95% din produsul transformat.

In procesul de bioconversie a steroizilor, microorganismele au rolul unor reactivi *sui-generis*, cu acţiune specifică şi care realizează uşor şi cu randament mare, un proces greu de realizat pe cale chimică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

GRUPE DE MICROORGANISME EUCARIOTE

Alge

Denumirea de "alge", în limba latină înseamnă "iarbă de mare", cu referire la reprezentanţii macroscopici ai grupului. Ramura botanicii care studiază algele se numeşte *phycologie* (*phycos*, grec = iarbă de mare).

Algele cuprind un grup heterogen de organisme eucariote, cu particularităţi distinctive. In general sunt fotosintetizante şi nu au diferenţieri tisulare complexe sau structuri reproducătoare înalt specializate. Conţin *clorofila a*, ce se deosebeşte de alte clorofile prin prezenţa grupării $-CH_3$, pe inelul structurii sale.

Cele mai multe alge sunt organisme libere în apa dulce şi sărată sau în sol. Unele stabilesc raporturi simbiotice cu fungii, cu plantele şi animalele şi numai rareori sunt parazite la organismele superioare.

Algele unicelulare sunt cele mai reprezentative organisme ale *planctonului* (forme microscopice de viaţă care plutesc liber în pătura superficială a pânzelor de apă) şi formează *fitoplanctonul*, în timp ce *zooplanctonul* cuprinde organismele animale mici. Planctonul stă la baza câtorva lanţuri trofice. Fitoplanctonul reprezintă veriga esenţială a reţelei trofice a oceanului, sursa majoră de hrană pentru multe specii de animale.

Organizare celulară şi fiziologie

Algele sunt organisme eucariote, cu o variaţie largă a dimensiunilor şi a aspectului morfologic. Dimensiunile acoperă un spectru foarte larg, de la câţiva micrometri (cele microscopice), până la zeci de metri, filamentoase, cu tal *cormoid*, ca de exemplu, *Macrocystis* (cormofitele sunt plante al căror corp vegetativ este alcătuit din rădăcină, tulpină şi frunze). Unele alge sunt unicelulare, iar altele, multicelulare, cu diferenţieri structurale. Cele unicelulare apar într-o varietate de forme: sferice, ovalare sau poliedrice. Algele pluricelulare sunt filamentoase sau masive. Uneori, cariochineza nu este urmată de citochineză: ca urmare, se formează o structură filamentoasă, tubulară, polinucleată. Alteori, unele alge microscopice (de exemplu, *Volvox*) formează colonii de celule vizibile cu ochiul liber. Alte alge microscopice (de exemplu, diatomeele) au structuri tridimensionale perfecţionate. Ele se aseamănă cu o cutie, deoarece o parte a peretelui celular o acoperă pe cealaltă, asemănător unei cutii cu capac.

Algele *macroscopice* sunt organisme multicelulare. Ele posedă structuri specializate, care deservesc funcţii specifice. Multe au o structură diferenţiată, denumită *crampon*, prin intermediul căreia, alga se fixează pe substrat. Cramponul este o structură care are rol exclusiv mecanic (de ancorare) şi nu are funcţie de absorbţie a apei sau a nutrienţilor. Deşi ating, uneori, dimensiuni considerabile, algele nu prezintă structuri diferenţiate pentru transportul substanţelor nutritive. De fapt, nici nu este nevoie de astfel de structuri, deoarece algele sunt imersionate în apa în care se găsesc solubilizate toate substanţele nutritive.

Multe alge mari au *vezicule pline cu gaz* sau alte structuri cu rol de flotaţie, prin care talul algal îşi menţine poziţia adecvată faţă de incidenţa optimă a luminii. La *Nereocystis luetkeana*, vezicula gazoasă are câţiva centimetri lungime. Cramponul se continuă cu pedunculul algal, denumit *stip* sau *cauloid*. Pedunculul algal, rigid sau flexibil susţine partea vegetativă fotosintetizantă a algei. La algele macroscopice, creşterea este fie apicală, fie generalizată (pe toată lungimea filamentului).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Peretele celular este rigid şi conţine celuloză, de obicei asociată cu o pectină şi cu alţi compuşi (de exemplu, acid alginic, manan, xilan, agar, caragenina) şi unele substanţe anorganice (de exemplu, Si, Ca).

Clorofila este localizată în structurile cloroplastelor. Tot aici se găsesc şi alte tipuri de pigmenţi (carotenoizi), precum şi substanţe de rezervă depozitate temporar: granule de amidon, picături lipidice.

Algele sunt organisme fotosintetizante şi pentru a capta energia luminoasă de diferite lungimi de undă, posedă trei tipuri de pigmenţi: *clorofile, carotenoizi* (caroteni şi xantofile) şi *ficobiline*. Diferenţele structurii lor moleculare determină lungimea de undă pe care fiecare categorie de pigmenţi o poate absorbi.

Clorofila a este prezentă la toate algele. Ea absoarbe lumina roşie şi transmite lumina verde. Se găseşte la toate organismele eucariote fotosintetizante şi la cianobacterii şi este esenţială pentru fotosinteză. Clorofila *a*, deşi este totdeauna prezentă, poate fi mascată de alţi pigmenţi, la diferite grupe de alge. Unele alge apar *brune*, deoarece conţin o cantitate mare de xantofile şi caroteni, care transmit culoarea brună, mascând culoarea verde transmisă de clorofila *a*. Alte alge sunt *roşii* sau *purpurii*, culoare conferită de ficobiline.

Consecinţa directă a intensităţii crescute a fotosintezei, este sinteza în exces a glucidelor şi depozitatea lor ca substanţe de rezervă. Natura chimică a rezervelor sugerează raportul filogenetic al diferitelor grupe de alge, cu plantele superioare. De exemplu, algele verzi depozitează *amidon,* ca şi plantele superioare cu care au şi alte caractere comune. Algele brune depozitează *laminarina* (un polimer de glucoză). Alte alge depozitează *lipide*, ceea ce le conferă o densitate mai mică decât a apei. Astfel, algele plutesc la suprafaţa apei şi dobândesc avantajul incidenţei maxime a luminii pentru fotosinteză.

Toate algele fotosintetizante şi-au dobândit modalităţi speciale de reglare a gradului de expunere la lumină. Una din formele de adaptare este răspunsul *fototactic*, ce constă în capacitatea algei de a se deplasa, activ sau pasiv, spre sau de la sursa de lumină. Fototaxia este prezentă la reprezentanţii tuturor grupelor majore de alge, cu excepţia celor roşii, care nu au forme flagelate. Algele au capacitatea de a recepţiona stimulii luminoşi, prin aşa numitele *antene direcţionale faţă de unda luminoasă*. Acestea sunt conectate cu aparatul de locomoţie a celulei. Antenele direcţionale sunt independente de aparatul fotosintetic. Arhitectura suprafeţei celulare, precum şi poziţia sa în timpul deplasării sunt expresii ale fototaxiei. Schimbarea poziţiei celulei faţă de lumină, produce modificări ale distribuţiei luminii în celulă.

Reproducere

Algele se reproduc pe cale *asexuată* sau *sexuată*.

Cea mai răspândită modalitate de *reproducere asexuată* este *diviziunea mitotică*. Fiecare celulă rezultată din diviziune primeşte jumătate din cantitatea de ADN a celulei parentale. De cele mai multe ori, diviziunea se realizează după un plan transversal. Algele multicelulare se înmulţesc asexuat printr-un proces de *fragmentare*. Filamentele lungi se rup şi fiecare fragment îşi reia creşterea. Cea mai evoluată modalitate de înmulţire asexuată este prin *spori*. Majoritatea algelor produc spori unicelulari, celule specializate care germinează fără să fuzioneze cu alte celule. Sporii algelor aquatice sunt mobili, prin intermediul flagelilor şi se numesc *zoospori*, iar cei imobili poartă denumirea de *aplanospori*.

Reproducerea sexuată este rezultatul unirii a două celule specializate denumite *gameţi*. La alge, ca şi la celelalte organisme eucariote, reproducerea sexuată presupune formarea gameţilor, printr-un proces în care are loc reducerea numărului de cromosomi, denumit *meioză*. Gameţii sunt celule haploide şi prin fuziunea lor, se reface numărul diploid de cromosomi caracteristic speciei. Produsul fuziunii gameţilor este *zigotul diploid*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Meioza se produce în stadii diferite ale ciclului de viaţă. La unele organisme, ciclul de viaţă este dominat de *faza diploidă*. La altele, la germinare, zigotul suferă meioza, iar ciclul de viaţă este dominat de *faza haploidă*. La multe alge microscopice există o alternanţă a fazelor haploidă şi diploidă. Generaţia haploidă se numeşte *gametofit*, iar cea diploidă poartă denumirea de *sporofit*.

Clasificare

Clasificarea algelor se bazează pe proprietăţile generale, comune membrilor unui grup: pigmenţi fotosintetizanţi, tipul de substanţă de rezervă, mecanismele mobilităţii, modul de reproducere. Denumirile grupelor de alge derivă din culoarea caracteristică, dominantă a grupului.

Chlorophyta, Chlorophycophyta(Alge verzi)

Algele verzi formează cel mai comun grup de alge şi au cele mai multe asemănări cu plantele: au clorofile de tip *a* şi *b* şi principalul produs depozitat este *amidonul*. Toate au pereţi celulari formaţi din celuloză şi pectină.

Algele verzi sunt foarte diversificate sub aspect morfologic: de la cele microscopice unicelulare sau coloniale, până la cele macroscopice pluricelulare, filamentoase sau cu tal masiv. Majoritatea trăiesc în apele dulci, puţine fiind prezente în mediul marin. Sunt abundente în straturile superficiale ale mediilor aquatice. Puţine cresc la adâncimi mai mari de 8 metri, deoarece lumina nu pătrunde la adâncimi mai mari. Unele alge verzi se găsesc pe suprafaţa zăpezii, pe trunchiul copacilor, în sol sau în raporturi simbiotice cu fungii cu care formează *lichenii*, cu protozoarele, cu anemonele de mare, cu hidra.

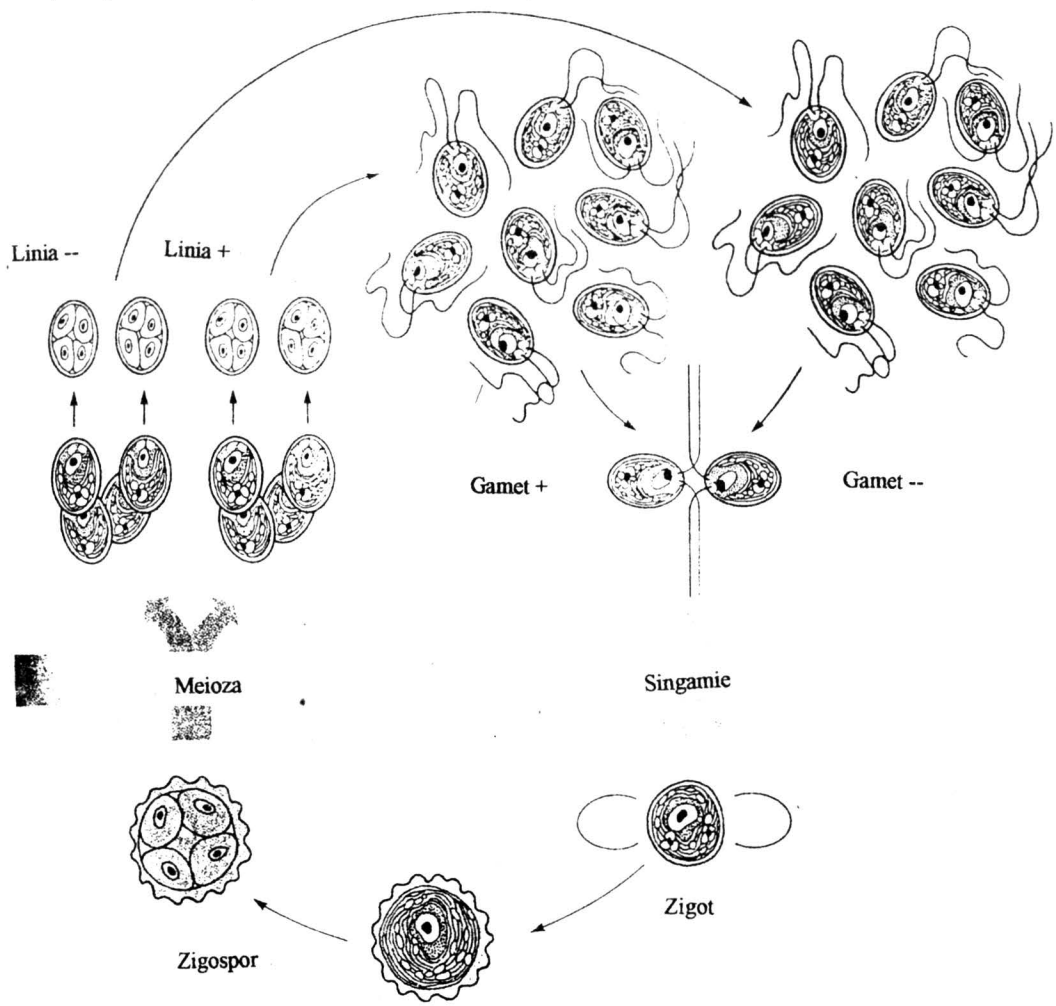


Fig. 235. Ciclul de viaţă la *Chlamydomonas*. Alga unicelulară se reproduce sexuat prin fuziunea unor celule cu polaritate sexuală opusă. După fuziune se formează zigotul, o celulă cu pereţi groşi. După o perioadă de repaus, zigotul se divide meiotic şi rezultă 4 celule haploide, care se divid asexuat prin fisiune binară.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

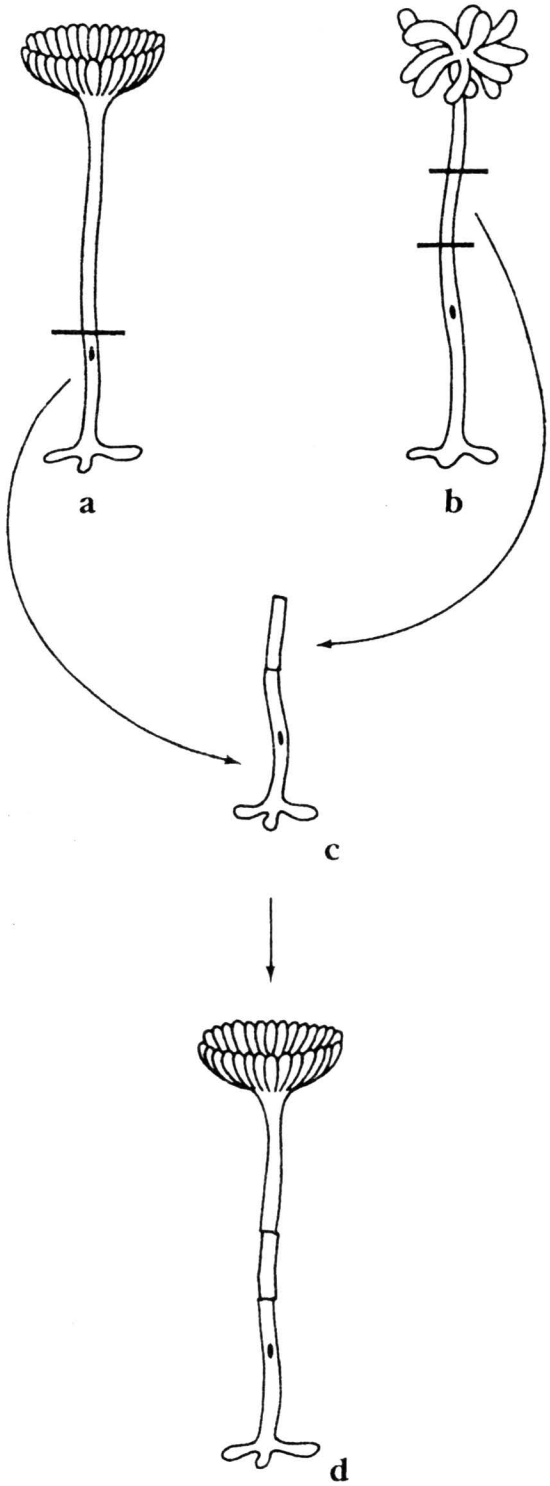


Fig. 236. Celulele diferitelor specii de *Acetabularia* (a, b) pot fi grefate (c). Partea superioară formată de alga grefată este caracteristică speciei donoare a nucleului (d). Experienţele au evidenţiat că nucleul determină atât capacitatea de a regenera constituienii celulari, cât şi specificitatea componentelor celulare regenerate.

Chlamydomonas este reprezentantul comun al grupului. Este o algă unicelulară, ovoidă. Celula conţine un cloroplast mare, în care este localizată *stigma*, organitul foto-receptor. La partea anterioară a celulei, proemină doi flageli identici. Celula are două vacuole contractile, cu funcţie excretoare.

Celulele de *Chlamydomonas* se reproduc asexuat şi sexuat. În cursul reproducerii asexuate, celula îşi pierde flagelii şi se divide mitotic în 4 (sau 8 ori 16) celule fiice, în interiorul celulei parentale. Fiecare celulă fiică secretă propriul perete şi îşi formează flagelii. Celulele fiice sunt eliberate sub acţiunea unei enzime care lizează peretele parental.

Reproducerea *sexuată* este indusă prin epuizarea sursei de azot a mediului. În timpul înfometării, celulele sintetizează molecule de suprafaţă care măresc adezivitatea reciprocă. Celulele formează aglomerări şi în interiorul acestora, se unesc în perechi şi după dizolvarea locală a peretelui celular, fuzionează. Celula rezultată prin fuziune, sintetizează un perete gros şi intră într-o fază de latenţă (dormindă). La sfârşitul acesteia, are loc meioza şi rezultă 4 celule, fiecare cu propriul perete şi câte doi flageli.

Acetabularia este unicelulară, dar macroscopică, putând atinge 10 centimetri. Nucleul este unic, situat la baza pedunculului, ce seamănă cu o tulpină. Pedunculul se termină cu o structură lamelară, asemănătoare unei frunze.

Fragmentul de tal ce conţine nucleul, poate regenera restul algei, dar poţiunile fără nucleu au capacitate foarte limitată de regenerare. Se pot grefa diferite regiuni ale talului de *Acetabularia*, de la specii diferite. Caracteristicile morfologice ale hibridului sunt determinate de tipul morfologic al speciei, care, la grefă, contribuie cu fragmentul nucleat. Nucleul condiţionează capacitatea de regenerare şi determină aspectul morfologic al regiunii lamelare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Spirogyra este o macroalgă cu tal filamentos, neramificat ce formează mase mucilaginoase plutitoare în ochiurile mici de apă dulce şi în canalele de drenaj. Denumirea ei reflectă aspectul helical al cloroplastului.

Reproducerea asexuată se face prin fragmentarea talului. Este modalitatea comună de reproducere.

Reproducerea sexuată este precedată de *procesul conjugării*. Celulele din filamentele adiacente, formează tuburi de conjugare ce se extind, fuzionează şi formează un canal intercelular. Conţinutul unei celule trece prin canalul de conjugare şi fuzionează cu conţinutul celulei adiacente. Zigotul care rezultă, dezvoltă un perete celular gros, rezistent şi devine *zigospor*. La germinarea zigosporului are loc meioza.

Ulva (salata de mare) este comună pe linia ţărmului. Talul este aplatizat ca o frunză şi se ancorează de substrat prin crampon.

Speciile genului *Codium* au celule foarte mari, ramificate, multinucleate, ce rezultă prin diviziuni nucleare succesive, fără clivarea peretelui transversal.

Phaeophyta (Alge brune)

Algele brune sunt exclusiv organisme marine. In Oceanul Atlantic, creşterea algei *Sargassum* este atât de abundentă încât a dat denumirea regiunii.

Creşterea algelor brune este foarte rapidă. Intr-un singur an, *Nereocystis* atinge dimensiunea maximă de 40 de metri. Macroalgele brune prezintă un tal cu diferenţieri tisulare şi reguni morfofunctionale: crampon, stip, vezicule, filoizi.

Algele brune conţin *clorofilă a, clorofilă c* şi pigmenţi carotenoizi (xantofila şi fucoxantina), care conferă algelor culoarea brună sau verde-oliv.

Substanţele de rezervă a algelor brune sunt *laminarina* (un polimer de glucoză, resturile fiind legate beta – 1,3) şi manitolul (un alcool). In peretele celular, unele au *algine* (sunt poliuronide, echivalente ale substanţelor pectice).

Cele mai multe alge brune se reproduc asexuat prin zoospori, dar şi pe cale sexuată prin fuziunea gameţilor, asemănători sau diferiţi ca morfologie.

Rhodophyta (Alge roşii)

Culoarea roşie este dată de un pigment ficobilinic dominant, *ficoeritrina*. Impreună cu ficocianina, maschează culoarea verde a *clorofilei a*. Ele sunt adaptate sa absoarbă culoarea verde, violetă şi albastră a spectrului vizibil, care penetrează adânc în apă. Raportul cantitativ variat al pigmenţilor, explică nuanţele de culoare de la roşu aprins până la albastru-verde, ale unor specii.

Algele roşii cresc la adâncimi de până la 175 de metri în apele marine tropicale, deşi unele se găsesc în apele mai reci.

Materialul de rezervă a algelor roşii este un compus special, denumit amidon de floridee.

Peretele celular algal conţine celuloza şi polizaharide sulfatate: agar şi caragenina. Speciile genului *Corallina* pot să depoziteze $CaCO_3$ în pereţii celulari şi au avut rol important în formarea recifelor de corali.

Cele mai multe alge roşii cresc fixate de diferite suporturi, inclusiv de alte alge. Foarte puţine specii plutesc libere.

Reproducerea este predominant asexuată, prin spori imobili. Reproducerea sexuată implică fuziunea celulelor sexuale diferenţiate.

Bacillariophyta (Diatomee)

Grupul diatomeelor reuneşte organisme unicelulare de o mare diversitate morfologică. Culoarea galben-brună este dată de pigmenţii carotenoizi (fucoxantina). In peretele celular se găseşte pectina, dar lipseşte celuloza. Peretele este impregnat cu compuşi ai siliciului şi este foarte rigid.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Diatomeele reprezintă o proporţie importantă a algelor ce constituie planctonul din apa dulce şi sărată. Ele cresc abundent chiar în regiunile arctice. Cele mai multe specii de diatomee sunt autotrofe, dar unele specii care trăiesc în profunzimea pânzei de apă pot să absoarbă materia organică şi nu fac fotosinteză.

Carapacea care acoperă o diatomee se numeşte *frustula*. Pe baza simetriei arhitecturii lor, frustulele sunt *centrice* (cu simetrie radiară) sau *penate* (cu simetrie bilaterală).

Peretele frustulei este alcătuit din două jumătăţi, denumite *valve*. Jumătatea superioară se numeşte *epivalvă*, iar cea inferioară, *hipovalvă*. Cele două jumătăţi ale frustulei sunt delimitate de *rafeu* (fanta din mijlocul frustulei).

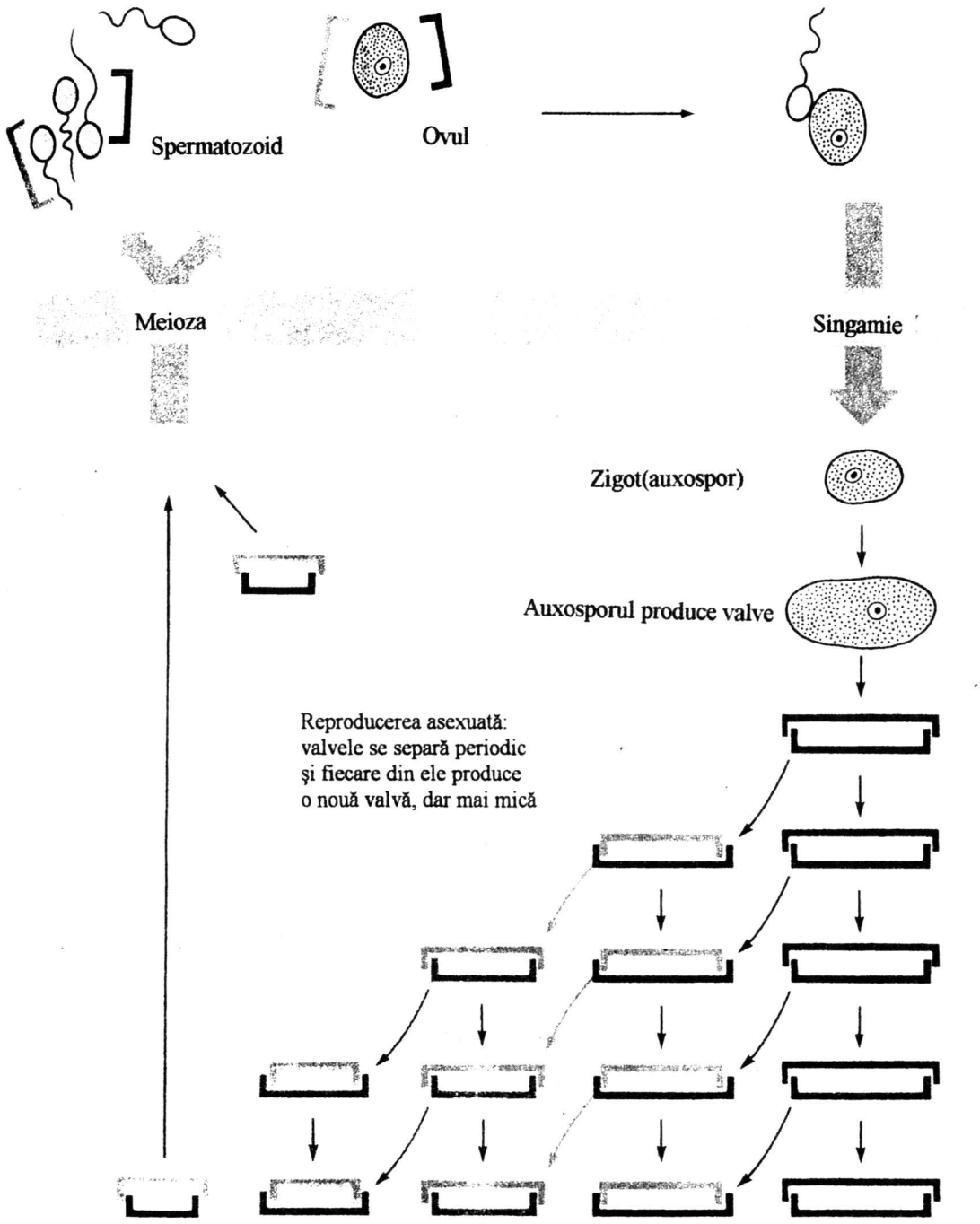


Fig. 237. Reproducerea diatomeelor se face în special pe cale asexuată. Fiecare celulă primeşte o valvă parentală şi îşi formează o valvă nouă (culoare deschisă), de dimensiuni mai mici decât valva parentală. În câteva generaţii, dimensiunile valvelor diminuă semnificativ. Când reducerea a atins 30% se declanşează stadiul reproducerii sexuate şi se restabilesc dimensiunile iniţiale ale celulei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reproducerea asexuată, prin diviziune este calea obişnuită de multiplicare. Fiecare celulă fiică primeşte câte o valvă din cele două ale celulei parentale. La unele specii, jumătatea nouă a frustulei are dimensiuni mai mici, astfel încât să acopere jumătatea originală. Continuarea acestui proces pentru mai multe generaţii, conduce la scăderea dimensiunilor. De aceea, când dimensiunea frustulei scade cu 30% din cea iniţială, începe un stadiu de reproducere sexuată, în cursul căreia frustula îşi restabileşte dimensiunile normale.

Din grupul diatomeelor fac parte algele galben-brune, ce formează o parte din nanoplanctonul oceanic (organisme cu diametrul mai mic de 75 μm). Unele din speciile acestui grup sunt amoeboide.

Pyrrophyta (Dinoflagelate)

Dinoflagelatele formează un grup divers de organisme unicelulare biflagelate sau fără flageli. Din cauza motilităţii lor, dar şi datoritâ capacităţii de a ingera particule solide, au fost considerate protozoare. Dinoflagelatele sunt răspândite în mediile marine şi dulci, unde sunt fotoautotrofe saprobionte, simbionte (cu anemone, spongieri, corali) sau chiar parazite.

Cele mai multe dinflagelate conţin clorofile de tip *a* şi *c*, mascate de pigmenţi carotenoizi (de culoare galbenă). Unele nu au clorofilă şi se hrănesc heterotrof.

Majoritatea reprezentanţilor acestui grup, au un perete celular denumit *teacă*, alcătuit din plăci ce conţin celuloză. Atât cele cu teacă, cât şi cele nude prezintă un şanţ transversal, la nivelul căruia, la speciile mobile, emerg doi flageli.

Cea mai comună formă de reproducere este diviziunea celulară. Unele se reproduc prin fragmentare. Altele formează zoospori şi spori imobili (aplanospori). La unii reprezentanţi s-a observat reproducerea sexuată.

Euglenophyta

Euglenoidele sunt un grup mic de microorganisme unicelulare, cu proprietăţi comune plantelor şi animalelor. Ca şi plantele, euglenoidele au aparat fotosintetic, asemănător cu acela al algelor verzi, dar, ca şi celula animală nu au perete celular şi ingeră hrană particulată.

Euglenoidele sunt delimitate de o membrană celulară groasă, denumită *peliculă*, ce prezintă un sistem de caneluri şi benzi ce merg paralel şi spiralat de-a lungul celulei. Benzile sunt formate din proteine flexibile, care se anastomozează şi au dispoziţie helicală în jurul celulei. Benzile proteice, împreună cu membrana plasmatică, formează pelicula, o structură foarte flexibilă, care permite celulei să-şi schimbe aspectul prin mişcare helicoidală şi reprezintă în acelasi timp o modalitate alternativă de locomoţie, pentru organismele ce trăiesc în mâl. Acesta este tipul de deplasare specific grupului, denumit *mişcare euglenoidă*, realizată printr-o succesiune rapidă de contracţii şi relaxări ale proteinelor helicoidale.

Alţi reprezentanţi sunt flagelaţi. Celula are doi flageli: unul este scurt, fără rol în mobilitate. Ambii se inseră la baza unei invaginări, la capătul anterior al celulei. Unii flageli au peri subţiri, foarte fini, ce proemină la exterior. In timpul mişcărilor flagelului, perii se răsucesc în jurul flagelului, mărind astfel eficienţa deplasării.

Euglenoidele au cloroplaste distribuite în toată celula. Pigmenţii cloroplastelor sunt carotenoizi şi clorofilieni. Fiecare cloroplast conţine un pirenoid, la nivelul căruia se depozitează un tip special de amidon, denumit *paramilon*, utilizat ca rezervă de hrană şi pentru resinteza constituienţilor cloroplastului. Cloroplastele fuzionează frecvent, fenomen care semnifică, după toate probabilităţile, schimbul de material genetic între aceste organite.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

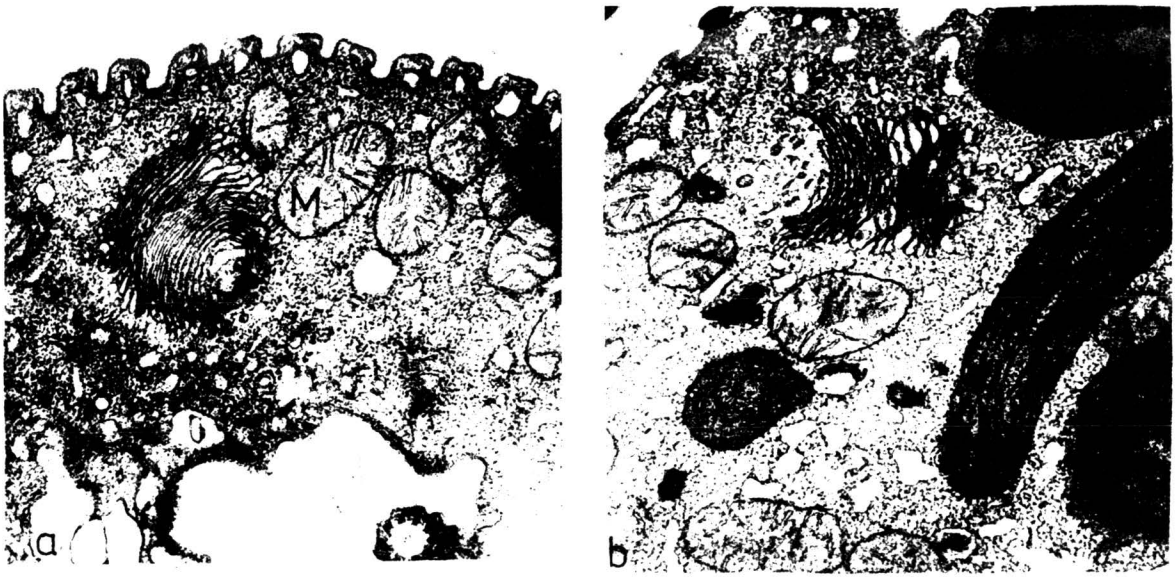


Fig. 238. Imagine electrono-optică a celulei de *Euglena* sp. (Original).

Celulele verzi de euglenoide prezintă în partea anterioară o structură (organit) pigmentată, sensibilă la lumină, denumită *stigmă*. Unele euglenoide au o vacuolă contractilă, prin intermediul căreia se elimină cataboliţii şi excesul de apă.

În condiţii nefavorabile de mediu, unele euglenoide formează structuri de rezistenţă, denumite *chişti*.

Reproducerea este asexuată, prin diviziune celulară simplă, binară. Nu se cunoaşte reproducerea sexuată.

În absenţa luminii, euglenoidele se hrănesc heterotrof, prin ingestia hranei particulate.

Importanţa algelor

În mediul aquatic, algele sunt producători primari în lanţul trofic şi servesc ca hrană pentru animalele mici, componente ale verigii trofice. Algele constituie *fitoplanctonul*, principala sursă de hrană pentru peşti, influenţând direct producţia piscicolă. Algele reprezintă sursa de hrană pentru zooplancton, pe seama căruia se hrănesc mamiferele aquatice mari. Viaţa în mediul marin, depinde de productivitatea primară a algelor.

Diatomeele sunt unice pentru că peretele lor celular conţine concentraţii mari de silicaţi, componente de bază ale nisipului, granitului şi sticlei. După moarte, silicaţii cochiliei se dizolvă rapid. În condiţii favorabile, structurile parietale se acumulează şi formează depozite de diatomee fosile, denumit *pământ de diatomită*. În unele locuri din SUA, depozitele au grosimi de circa 900 de metri. Pământul de diatomită se foloseşte ca abraziv în industria prelucrării prin lustruire a argintului, în producerea filtrelor de purificare a apei, ca izolant al cazanelor şi conductelor de vapori. Se adaugă în pasta de dinţi, având rol abraziv.

Diatomeele sunt producătoare de vitamna A şi D. Peştii consumă diatomeele şi concentrează vitaminele în ficat, de unde pot fi extrase pentru uz uman.

Algele verzi au un impact important asupra activităţii umane. Fotosinteza contribuie semnificativ la creşterea concentratiei de O_2 în atmosferă şi în sursele de apă. Unele se cultivă artificial şi se folosesc ca adaus în hrana animalelor, în proporţie de până la 10%. Se folosesc pentru purificarea apelor de anal şi a celor uzate industrial. Densitatea algelor într-o sursă de apă, este un indiciu al concentraţiei compuşilor cu azot, fosfor sau indiciu al gradului de poluare cu apă de canal.

Algele influenţează mirosul şi gustul apei. Ele colmatează filtrele sau produc intoxicarea şi chiar moartea prin intermediul *algatoxinelor*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Se studiază posibilitatea cultivării unor alge monocelulare, în condiţii economice, pentru a fi folosite în hrana omului, acolo unde deficitul de substanţe nutritive se amplifică.

Algele roşii furnizează două polizaharide de importanţă economică majoră: *agarul* şi *caragenina*. Agarul produs de algele din genurile *Gelidium* şi *Gracilaria*, are cea mai largă utilizare pentru solidificarea mediilor nutritive de uz microbiologic, pentru producerea capsulelor farmaceutice. Caragenina produsă de *Chondrus crispus* se foloseşte în unele regiuni, ca aditiv într-o varietate de produse alimentare, dar a fost folosită ca agent antiinflamator şi în tratamentul ulcerului.

Dintre *Phaeophytae*, *Macrocystis*, cea mai mare algă marină, este sursa substanţei *algina* (un polizaharid), utilizată în producerea adezivilor, a maselor plastice şi ca adaus în diferite produse alimentare: crema de îngheţată, şerbet. Laminarina (un polimer de glucoză) are valoare comercială, ca stabilizator şi emulsificator (emulsia este o suspensie de picături mici ale unui lichid în alt lichid, cu care nu se amestecă), pentru prepararea vopselei şi a altor produse.

Unele alge brune se folosesc ca sursă de vitamine în hrana animalelor de apartament şi ca sursă de hrană pentru animalele domestice. Se preconizează folosirea lor ca hrană pentru populaţia subnutrită.

Dinoflagelatele conferă miros şi gust neplăcut apei. Unele produc "mareea roşie", cu efecte toxice şi pot omorî peştii, nevertebratele sau produc intoxicaţii umane consective consumului de moluşte.

Diatomeele produc şi depozitează chrysolaminarina (un polizaharid) şi grăsimi (sub formă de uleiuri). Se consideră că au fost surse importante de petrol. Sunt indicatori ai schimbărilor geologice, fiind utile în studiul formării gheţarilor în nordul Europei. Sunt indicatori ai poluării apelor industriale.

"Înflorirea algală"

In mod obişnuit, prezenţa algelor microscopice în apă nu este evidentă. Uneori însă, în condiţii favorabile de mediu (creşterea concentraţiei compuşilor cu azot, fosfor sau consecutiv poluării cu apă de canal), densitatea lor creşte exploziv şi formează un strat la suprafaţa apei. Fenomenul se numeşte "înflorire" şi este limitat de disponibilitatea nutrienţilor esenţiali specifici: azotaţi, fosfaţi. Dacă nutrienţii se găsesc în concentraţii mari, creşterea algală poate acoperi întreaga suprafaţă a apei. De multe ori, apele menajere şi industriale, deversate în bazinele de apă aduc nutrienţi, rezultatul fiind eutrofizarea ("suprafertilizarea") mediului aquatic. In lacurile poluate, "înflorirea" algală poate avea dimensiuni uriaşe. Când masele uriaşe de alge mor, descompunerea lor sub acţiunea fungilor şi bacteriilor, epuizează întreaga cantitate de O_2 dizolvat, provocând moartea prin hipoxie a organismelor aquatice.

Importanţa medicală a algelor

Un număr restrâns de alge sunt implicate în patologia umană.

Prototheca este singura algă responsabilă de producerea unei stări patologice infecţioase şi numai sub formă unei infecţii secundare. A fost considerată ca aparţinând fungilor, deoarece este incoloră, nu conţine clorofilă, dar recent s-a demonstrat că este o varietate a algei *Chlorella*, ce s-a adaptat la nutriţie heterotrofă, prin pierderea cloroplastului. *Prototheca* se poate izola din apă, din apă de canal şi din tractul gastrointestinal. Infecţia apare numai în stările de deficienţă a funcţiei imunitare. La om produce leziuni tegumentare şi bursita (inflamaţia cavităţilor articulare).

Persoanele care lucrează fără protecţie cu pământul de diatomee, fac silicoză, datorată prafului inhalat, ce conţine o mare cantitate de siliciu. Hiperplazia guşogenă a glandei tiroide este frecvent rezultatul ingestiei unor cantităţi mari de alge bogate în iod.

Algele verzi şi diatomeele elimină algatoxine, care produc leziuni tegumentare, similare stărilor de hipersensibilite de contact.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Gonyaulax şi *Gymnodinium* produc o toxină cu efect asupra ţesutului nervos, ce provoacă paralizii. Pericolul intoxicării paralitice, creşte în sezoanele în care se produc "înfloriri" cu aceste dinoflagelate. Când densitatea celulelor algale creşte la 50 000/ml, apa se colorează. Fenomenul este cunoscut sub denumirea de "mareea roşie" şi indică abundenţa neurotoxinei în moluştele zonei (midii, stridii).

Densităţile celulare mici, care nu schimbă culoarea apei sunt totuşi periculoase. Ingestia a 0,5 mg toxină, poate fi fatală pentru om. Cantitatea se găseşte în sute de grame de moluşte şi este stabilă după îngheţare sau prelucrare obişnuită. Nu se cunoaşte antidotul faţă de neurotoxina dinoflagelatelor. Moartea poate surveni în 3-12 ore. Pentru reducerea nivelului toxinei se provoacă reflexul de vomă.

Algele verzi sunt foarte importante din punct de vedere teoretic. Unii botanişti consideră ca plantele au evoluat din algele verzi.

Protozoare

Protozoarele au fost descrise în 1674 de Antony van Leeuwenhoek. Alături de alge şi de fungi, protozoarele constituie un grup de protiste eucariote, considerate tradiţional ca făcând parte din lumea microorganismelor. Protozoarele sunt organisme unicelulare, eucariote, lipsite de perete celular, a căror modalitate tipică de nutriţie este *ingestivă*, prin fagocitoză.

Limitele celor trei grupe de microorganisme eucariote nu sunt clare. Există organisme cu proprietăţi comune algelor şi protozoarelor sau fungilor şi protozoarelor. De exemplu, liniile mutante de *Chlamydomonas* şi *Volvox*, fără clorofilă sunt clasificate printre protozoare, iar cele cu clorofilă sunt considerate că aparţin algelor. Euglenofitele sunt un grup de microorganisme unicelulare, flagelate, care de cele mai multe ori, au clorofilă şi sunt fotosintetizante. De aceea sunt clasificate printre alge. Dar speciile de euglenofite pot să crească pe medii complexe, la întuneric şi de aceea unii autori aşează întregul grup printre protozoare.

Mixomicetele celulare şi plasmodiale sunt considerate ca fungi sau ca protozoare.

Majoritatea protozoarelor sunt organisme care trăiesc liber şi sunt mobile. Unele sunt microscopice (de câţiva μm), iar altele se văd chiar cu ochiul liber (1 mm). Unele sunt parazite, pe gazde foarte diverse: alge, nevertebrate, vertebrate şi chiar la om.

Se cunosc peste 45 000 de specii de protozoare. Toate necesită medii umede, indiferent de habitat: în apa dulce şi marină, în sol sau parazite la alte organisme.

Protozoarele se dezvoltă în mediile care conţin substanţe organice, pe seama cărora se dezvoltă bacteriile. La rândul lor, bacteriile constituie o sursă foarte importantă de hrană a protozoarelor.

Apele bogate în vegetaţie aquatică (ape puţin adânci, lacuri artificiale, canale, mlaştini), sunt favorabile dezvoltării protozoarelor. In mediul marin, macroalgele şi vegetaţia mlaştinilor sărate, sunt habitate favorabile protozoarelor. Ele sunt abundente în instalaţiile de tratare a apelor menajere, în special în nămolul activ.

Multe protozoare trăiesc comensale în tractul digestiv al animalelor.

Unele protozoare sunt parte componentă a zooplanctonului şi se hrănesc cu algele fitoplanctonului: altele tot acvatice, sunt fixate pe diferite suporturi. Puţine protozoare populează habitate foarte specializate: intestinul termitelor, compartimentul ruminal. Ele au raporturi mutual-benefice cu gazdele.

Protozoarele care au capacitatea de descompunători ai materiei organice, contribuie la fertilizarea solului. Cele prădătoare au un rol deosebit de important în controlul numeric al diferitelor populaţii de microorganisme, deoarece se hrănesc pe seama acestora.

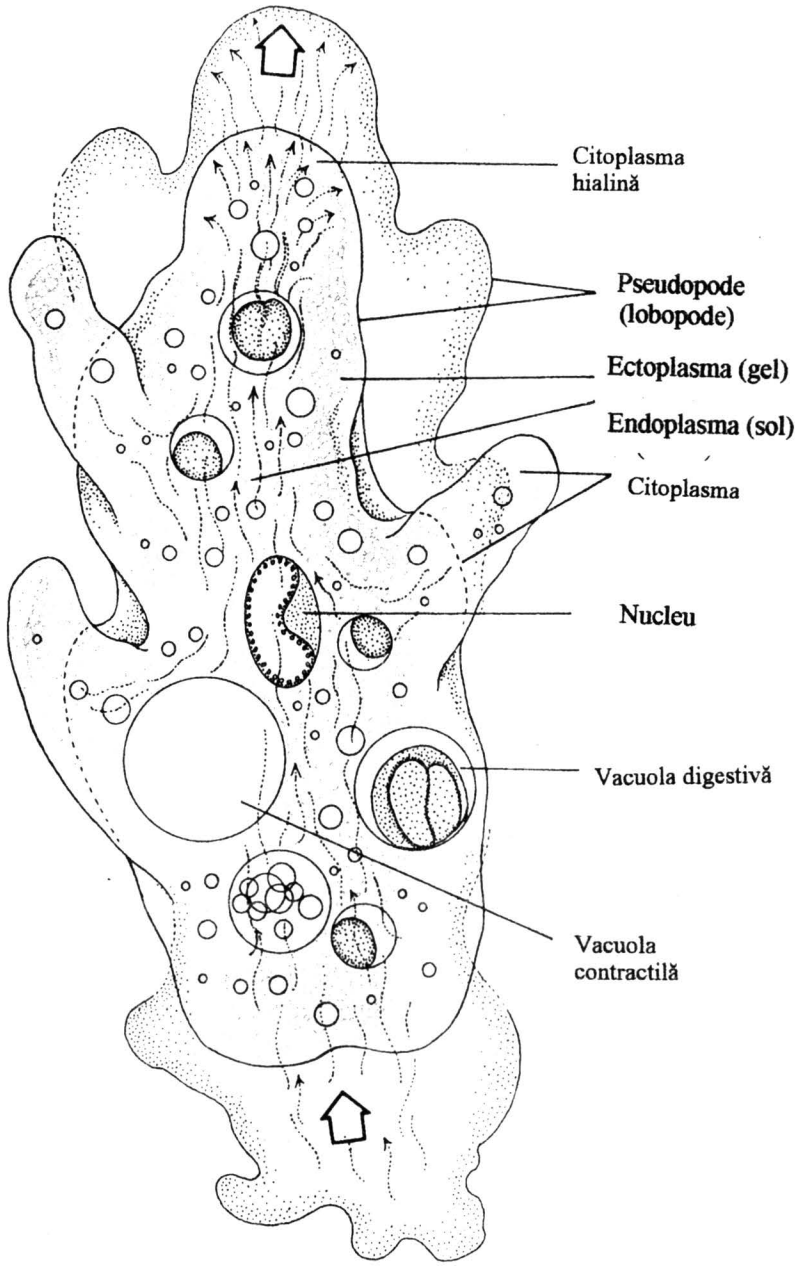
Formele parazite produc boli la om şi animale: de exemplu, boala somnului, dizenteria amoebiană, malaria, toxoplasmoza etc.

Organizare celulară şi fiziologie

Complexitatea funcţiilor esenţiale ale celulei protozoarelor necesită specializarea diferitelor componente. Celula protozoarelor este una dintre cele mai complexe din lumea vie: ea posedă organite implicate în obţinerea şi digestia substanţelor nutritive, în excreţie şi osmoreglare, în reproducere, protecţie, recepţionarea stimulilor, locomoţie etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 239. Deplasarea amoebiană. Săgeţile indică direcţia deplasării.



Deplasarea. Locomoţia protozoarelor se realizează prin trei tipuri de organite: pseudopode, flageli şi cili.

Pseodopodele sunt prelungiri celulare temporare, prezente la membrii grupului *Sarcodina*. Ele pot fi *loboodii* (rotunjite), alcătuite din ectoplasmă şi endoplasmă, *filopodii* (prelungiri lungi şi ascuţite), alcătuite numai din ectoplasmă sau *rizopodii* (prelungiri citoplasmatice ramificate).

Pentru deplasare, ectoplasma (pelicula superficială a citoplasmei) mai vâscoasă, se fluidizează. Din cauza presiunii interne, în acest punct, citoplasma formează un pseudopod. Pe măsură ce endoplasma fluidă înaintează, ea se schimbă în ectoplasmă mai vâscoasă şi ancorează pseudopodul de suport. Întreaga celulă este deplasată în direcţia punctului de fixare a pseudopodului. Pseudopodele au rol esenţial în procesul fagocitării materialului nutritiv particulat.

Flagelii protozoarelor sunt organite de locomoţie, lungi şi delicate. Structura şi organizarea flagelilor este aproximativ aceiaşi la toate categoriile de celule eucariote:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

doi microtubuli centrali, înconjuraţi de 9 dublete tubulare periferice. Aranjamentul celor 9 x 2 + 2 tubuli centrali, este caracteristic pentru majoritatea cililor şi flagelilor celulelor eucariote, de la *Euglena* până la om.

Protozoarele nu au perete celular. Invelişul extern sau teaca unui flagel este o continuare a membranei celulare. La baza fiecărui flagel, se găseşte un granul denumit *kinetoplast*, care conţine ADN.

La cele mai multe flagelate, celula este prevăzută cu 1-2 flageli. La un grup de flagelate parazite în intestinul termitelor, celula are zeci de flageli. Există flagelate libere cu 4, 8 sau mai mulţi flageli.

Cilii sunt flageli miniaturali. Structura internă este aceiaşi ca şi a flagelului: doi microtubuli centrali şi 9 dublete periferice, acoperiţi de un înveliş, care este o continuare a membranei celulare. Membrana citoplasmatică are o consistenţă specială şi se numeşte *peliculă*. Fiecare cil are la origine, un granul bazal.

Cilii pot să acopere întreaga suprafaţă a celulei sau au o distribuţie limitată, în special la polul oral. La unele specii, cilii fuzionează în mănunchiuri compacte denumite *cirri*. Lungimea cililor este variată. Cei de la extremităţile celulei sunt mai lungi.

Pentru mişcarea perfect coordonată, cilii sunt conectaţi printr-o reţea de fibre situată sub membrana peliculară.

Nutriţia. In general, protozoarele se hrănesc prin ingestia materialului particulat sau macromolecular. Macromoleculele în mediul apos sunt înglobate prin *pinocitoză*. Majoritatea protozoarelor ingeră materialul particulat prin *fagocitoza*. Pinocitoza este relativ nespecifică şi continuă, iar fagocitoza este un proces discontinuu şi deasemenea nespecific.

Protozoarele sunt, în general, organisme aerobe, heterotrofe, rareori anaerobe (de exemplu, cele ce trăiesc în intestinul uman, în rumen sau în intestinul termitelor).

La protozoare se întâlnesc două modalităţi majore de nutriţie:

- unele sunt *autotrofe*, adică sintetizează compuşi organici din substanţe anorganice, pe cale fotosintetică. Sunt organisme producătoare de materie organică: glucide, proteine, lipide. Pot fi cultivate în soluţii de săruri anorganice, în condiţii de iluminare;
- majoritatea protozoarelor sunt heterotrofe, adică organisme consumatoare şi utilizează substanţele organice preformate.

Unele protozoare heterotrofe sunt *saprobionte*, adică se hrănesc prin absorbţia substanţelor nutritive. Altele sunt *holozoice*, adică ingeră hrană particulată din mediu. Ele posedă mecanisme pentru captarea şi ingestia hranei. Celula înglobează hrana particulată, într-o vacuolă de fagocitoză (fagosom), în care se eliberează conţinutul enzimatic lizosomal. In timpul digestiei, dimensiunile vacuolei cresc. Produsele de digestie trec în citoplasmă, iar materialele indigeste sunt excretate.

La grupul *Ciliophora*, hrana este ingerată printr-o regiune diferenţiată a celulei, o deschidere denumită *citostom*. Hrana particulată din mediul lichid, este orientată spre citostom, prin mişcarea ordonată a cililor.

Cultivare. Exigenţele nutritive ale protozoarelor sunt diferite. Cele libere se cultivă pe medii artificiale care conţin infuzie de fân, în apă de lac, la care se adaugă boabe de orez, de grâu, lapte degresat. Culturile pure (axenice) se obţin mai greu, deoarece multe protozoare necesită hrană particulată.

Mediile de creştere conţin hidrolizat de cazeină, extract de levuri, extract de carne, glucoză, minerale. Unele specii de *Amoeba* şi *Didinium* (flagelat) necesită adăugarea în mediul de creştere, a altor microorganisme (bacterii, protozoare) ca sursă de hrană.

Unele protozoare parazite au fost cultivate în ţesuturi crescute *in vitro*, iar altele în medii complexe, cu adaus de sânge integral sau de ser. Culturile sunt deosebit de importante pentru obţinerea vaccinului şi pentru testarea efectului agenţilor chimioterapeutici.

Cele mai multe protozoare parazite s-au cultivat în organismul animal: şobolan, şoarece, hamster. Anumite specii de *Plasmodium* se cultivă *in vivo*, prin inocularea puilor de găină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru protozoare nu există colecţii de culturi, aşa cum există pentru bacterii şi fungi.

Excreţia. Produsele de catabolism (CO_2, NH_3, uree şi alte substanţe difuzibile) sunt eliminate prin difuzie liberă, la nivelul întregii membrane citoplasmatice sau prin vacuole contractile.

La ciliate, materialele indigeste sunt eliminate printr-o zonă specializată, denumită *citopige*, localizat în poziţie opusă citostomului.

Majoritatea protozoarelor din apele dulci, posedă vacuole contractile. Ele acţionează ca nişte pompe pentru îndepărtarea excesului de apă care pătrunde în celulă, având astfel rol în reglarea osmolarităţii. Intr-o celulă, vacuola contractilă poate fi unică sau sunt multiple. Vacuola primeşte apă, fie direct din citoplasmă, ori, la *Paramecium*, este înconjurată de mai multe canale radiare, cu rolul de a colecta apa din celulă.

Ciliatele de apă dulce sau sărată, au totdeauna vacuole contractile, deoarece, chiar în mediul salin, învelişul celular este permeabil pentru apă şi impermeabil pentru săruri. Frecvenţa pulsaţiilor vacuolei, denumite *sistole*, depinde de cantitatea de apă care intră în celulă. Speciile dulcicole, după transferul în apă salină, îşi diminuă rata pulsaţiilor. Speciile mari au o frecvenţă mai mică a pulsaţiilor.

Sistemul vacuolei contractile este o membrană separatoare între conţinutul diluat (soluţie hipotonică) şi mediul celular cu presiune osmotică superioară.

Vacuola se deschide la nivelul unei zone specializate – un por - la suprafaţa celulei. La amoebă, porul este o structură temporară, ce se formează la începutul fiecărei pulsaţii, iar la parameci, porul este o deschidere permanentă.

Structuri speciale. Unele protozoare sunt sesile, fixate pe substrat, prin intermediul unei structuri specializate denumită *crampon*. Unele protozoare sesile au existenţă colonială. Celulele rezultate din diviziunea celulei mamă, rămân asociate formând colonii bi- sau tridimensionale, cu aspect şi dimensiuni caracteristice.

Majoritatea protozoarelor sunt organisme nude. Unii reprezentanţi ai grupului *Sarcodina* formează cochilii. Acestea sunt structuri externe rigide, secretate de celulă sau formate din materiale preluate din mediul extern (granule fine de nisip, frustule de diatomee) şi încorporate într-un material mucilaginos secretat de celulă. Sarcodinele din grupul *Foraminifera* produc, printr-un proces de secreţie, cochilii de carbonat de calciu, iar *Radiolaria* au cochilii de siliciu sau sulfat de stronţiu. Cochilia nu este totdeauna limita externă a celulei protozoarului, pentru că la multe foraminifere, protoplasma se extinde peste cochilie şi chiar o acoperă complet.

După epuizarea sursei de hrană, iar experimental şi sub acţiunea altor factori (de exemplu, diferite noxe), multe protozoare formează structuri de rezistenţă denumite *chişti*.

Reproducerea

Protozoarele se reproduc pe cale sexuată şi asexuată. Unele se reproduc numai pe cale asexuată. La unele protozoare, cele două modalităţi de reproducere pot să alterneze în timpul ciclului de viaţă.

In procesul reproducerii *asexuate*, celula parentală se divide simetric sau asimetric şi rezultă două sau mai multe celule. Fisiunea binară este cel mai comun tip de reproducere asexuată şi implică diviziunea mitotică a nucleului. In reproducerea prin fisiune binară nu se produce meioza şi nici fuziunea de gameţi.

Reproducerea aexuată se face şi pe alte căi: înmugurire, fisiune multiplă, urmată de citokineză. Prin înmugurire, la suprafaţa celulei parentale, se formează o nouă celulă, în care migrează unul din nucleii rezultaţi din diviziunea mitotică. Mugurele creşte progresiv, până se desprinde de celula parentală.

Fisiunea multiplă, denumită *schizogonie*, implică formarea unui organism multinucleat. Nucleul şi celelalte organite esenţiale se divid repetat, fără citokineză. Ulterior, se produce diviziunea, prin care, simultan, rezultă un mare număr de celule uninucleate. Fisiunea multiplă este caracteristică sporozoarelor parazite.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fig. 240. Modalitățile de reproducere asexuată la protozoare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reproducerea *sexuată* este comună la protozoare. Unele sunt diploide în cea mai mare parte a existenţei lor. Formarea gameţilor este consecutivă diviziunii meiotice. Celulele sexuale (gameţii) se unesc, fenomen denumit *singamie* şi formează *zigotul* diploid. Acest tip de reproducere se găseşte la sporozoare (*Plasmodium*).

La ciliate are loc un *schimb reciproc de macronuclei haploizi,* într-un proces de sexualitate denumit *conjugare*, care implică stabilirea unei punţi citoplasmatice între cele două celule conjugante. Micronucleul transferat de la donor, împreună cu micronucleul propriu, prin fuziune, formează un nucleu *zigot* (fertilizat).

Autogamia este o variantă simplificată a conjugării, deoarece procesele nucleare se petrec în interiorul unei celule. Micronucleul se divide meiotic. Se formează doi micronuclei, care se reunesc pentru a forma un nucleu zigot. Ulterior, celula se divide prin fisiune simplă şi rezultă două celule, fiecare având setul complet al structurilor nucleare.

O proprietate importantă a protozoarelor este capacitatea lor de a regenera o parte pierdută prin excizie sau lezare. De remarcat este faptul că regenerează numai porţiunea care conţine nucleul. Unele ciliate pot regenera întreaga celulă, din circa 10% din volumul celulei originale, dacă nucleul rămâne intact. Citostomul parameciului nu se regenerează după amputare.

Clasificare

Principalele grupe de protozoare se disting uşor pe baza criteriilor morfologice, a modului de obţinere a nutrienţilor, a organitelor de locomoţie, a organizării celulare, la care se adaugă analiza biochimică a acizilor nucleici şi a proteinelor, pentru a stabili gradul de asemănare sau de deosebire a unor specii foarte înrudite. Pe baza acestor criterii se disting următoarele grupe:

- grupul *Sarcodina*, la care locomoţia şi captarea hranei se fac prin intermediul pseudopodelor;
- grupul *Mastigophora* sau *Flagellata* posedă cel puţin un flagel, într-un anumit stadiu al ciclului de viaţă, cu rol în locomoţie;
- grupul *Sporozoa* cuprinde protozoare parazite, care se hrănesc prin absorbţia hranei din organismul gazdă. Nu au organite de locomoţie;
- grupul *Ciliophora* este caracterizat prin prezenţa cililor, cu rol atât pentru deplasare, cât şi pentru capturarea hranei.

Mastigophora(Flagelate)

Flagelatele se caracterizează prin prezenţa unuia sau mai multor flageli, într-un stadiu al ciclului de viaţă. Flagelii au rol în locomoţie, pentru obţinerea hranei şi sunt receptori pentru excitanţi. Flagelatele sunt cele mai apropiate, filogenetic, de alge. Unele alge (*Chlamydomonas, Volvox*) sunt adeseori clasificate ca flagelate.

Unii autori clasifică flagelatele în două grupe:

- *fitoflagelate* (asemănătoare cu plantele) conţin clorofilă şi sunt fotosintetizante. Depozitează amidon şi au perete celular celulozic. Reproducerea sexuată este comună;
- *zooflagelate* (asemănătoare organismelor animale) nu au pigment fotosintetizant şi sunt heterotrofe. Depozitează glicogen sau uleiuri. Nu au stadiul de reproducere sexuată.

Cele două subgrupe se aseamănă prin prezenţa flagelului ca organit de locomoţie, dar deosebirile sunt majore şi plasarea lor în aceiaşi unitate taxonomică este artificială.

Speciile g. *Euglena* au un statut aparte, datorită capacităţii lor de a se hrăni fotosintetizant sau heterotrof. Sub acţiunea unor agenţi chimici sau a radiaţiilor se poate induce pierderea cloroplastelor. Mutantele acloroplastice se hrănesc heterotrof.

Majoritatea flagelatelor sunt libere în apa dulce şi sărată. Altele trăiesc în sol sau în tractul intestinal al unor animale. Unele flagelate sunt parazite pentru om şi animale, fiind foarte importante din punct de vedere medical. Cele mai importante mastigofore patogene sunt tripanosomele, agenţii bolii somnului (*T. brucei, T. gambiense*). Lungimea lor este de 20 μm,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

subţiri, cu formă de semilună, uniflagelate, cu originea într-un corp bazal. Flagelul se orientează spre polul posterior, pe marginea celulei, fiind inclus într-o cută a membranei. Se formează un pliu membranar ondulator, ale cărui mişcări sunt coordonate de flagel. Membrana ondulantă măreşte eficienţa deplasării parazitului în sânge, a cărui vâscozitate este mai mare.

T. brucei şi *T. gambiense* sunt transmise prin înţepătura muştei ţeţe (*Glossina*). Netratată, victima devine somnolentă. Agentul patogen invadează sistemul nervos central şi produce inflamaţia ţesutului nervos, determinantă a manifestărilor neurologice ale bolii. Parazitul se multiplică prin fisiune binară în tractul intestinal al artropodului. Parazitul invadează glandele salivare, de unde este transferat la o nouă gazdă umană.

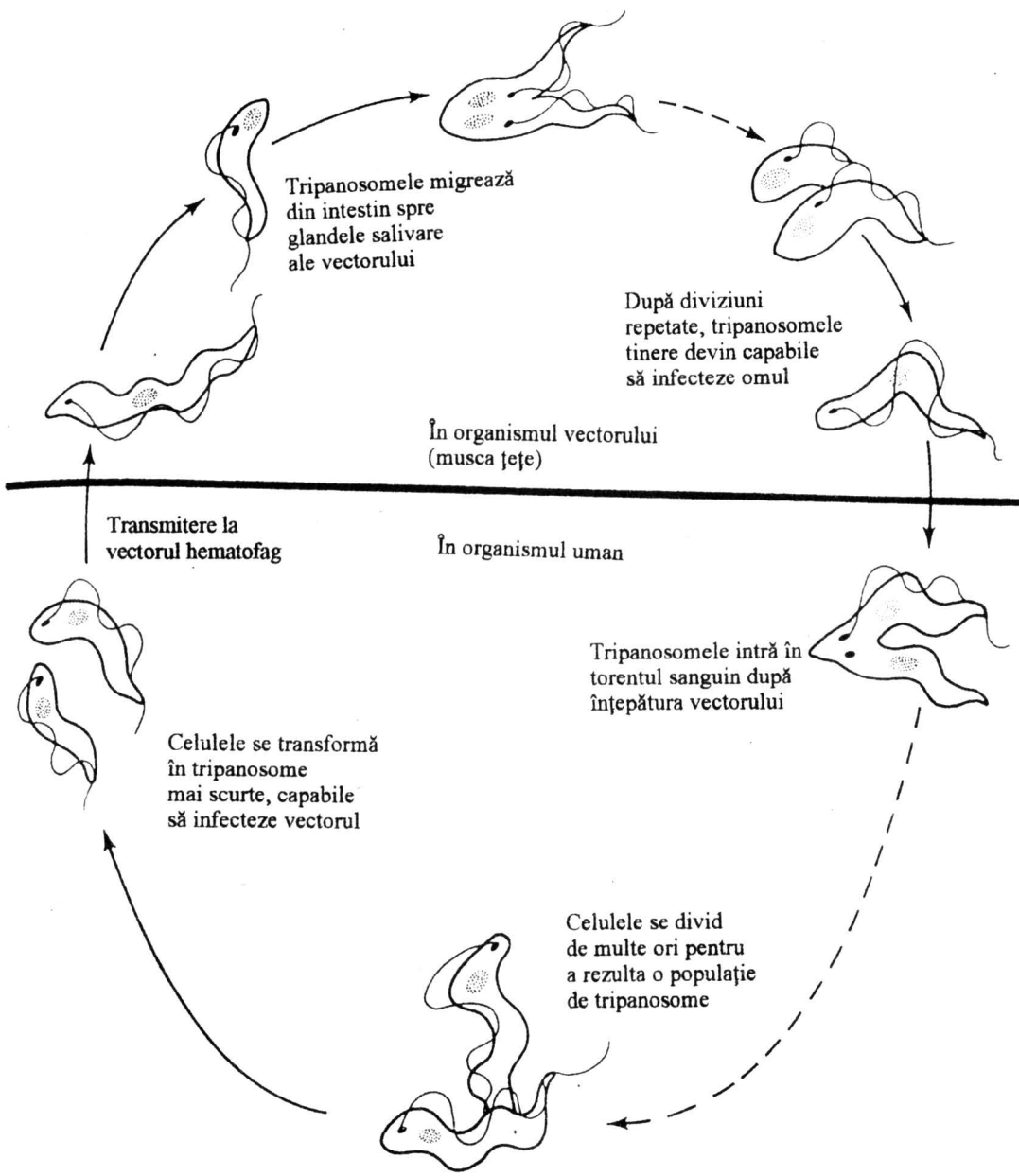


Fig. 241. Diagrama ciclului de viaţă la *Trypanosoma*. Dezvoltarea în organismul muştei ţeţe este necesară producerii formei infecţioase pentru organismul uman.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Leishmania sp. produce infecţia cutanată la om, denumită leishmanioza.

Giardia lamblia este unul dintre cele mai răspândite protozoare intestinale. Infectează omul şi animalele. Parazitul se ataşează de celulele mucoasei intestinale. În număr mare, celulele parazitului, interferă cu absorbţia substanţelor nutritive. Produce tulburări digestive diareice, dar şi manifestări nespecifice. Infecţia este diagnosticată prin identificarea chiştilor în materialele fecale. Sursa de infestare este apa sau alimentele vegetale contaminate de om sau de animalele bolnave. In comunităţile de copii, parazitul se transmite direct.

Trichomonas vaginalis este un flagelat mai răspândit decât *G. lamblia* şi produce o infecţie uşoară a vaginului.

Flagelatele din intestinul termitelor, constituie asociaţii reciproc benefice. Termitele ingeră lemnul, dar nu pot degrada celuloza. Flagelatele digeră celuloza şi furnizează glucide simple, atât pentru ele însele cât şi pentru gazdă.

Sarcodina

Protozoarele cuprinse în grupul *Sarcodina* sunt mai simple ca structură decât flagelatele şi ciliatele, deoarece au mai puţine diferenţieri celulare. Locomoţia şi capturarea hranei se realizează prin intermediul pseudopodelor. La amoebe apare şi mişcarea flagelară, pentru că unele specii formează şi celule flagelate în anumite condiţii de mediu nefavorabil şi astfel organismele se pot dispersa mai rapid.

Reprezentanţii grupului *Sarcodina* trăiesc în apă. Foarte interesante sunt subgrupele *Foraminifera* şi *Radiolaria*. Ambele formează cochilii. Cochiliile foraminiferelor sunt formate din calcar secretat de celulă, iar la radiolari, cochilia se formează din materiale exogene. Celula nu este ferm ataşată de cochilie şi de aceea îşi poate extinde pseudopodele prin unica sau numeroasele deschideri ale cochiliei.

La formele cochiliere, diviziunea celulară este o reminiscenţă a înmuguririi levurilor: se produce mitoza şi unul din nuclei se deplasează într-o porţiune a citoplasmei, care se extruzează prin apertura cochiliei. În jurul citoplasmei extruzate se secretă o nouă cochilie şi celula progenă se separă de celula parentală. Celula progenă are o cochilie nouă, iar celula parentală o păstrează pe cea veche.

Foaminiferele trăiesc în regiunile de coastă, iar radiolarii, în larg. La multe foraminifere apare un ciclu sexual şi în unele cazuri are loc o alternanţă de generaţii: celulele haploide şi diploide se divid şi formează linii celulare care se reproduc independent. Unele celule diploide se divid meiotic şi rezultă celule haploide care cresc vegetativ, înainte de a forma gameţi. Aceştia se împerechează şi refac organismul diploid.

Datorită greutăţii cochiliei, celulele cad pe fundul apei şi se hrănesc cu bacterii şi detritus. Cochiliile acumulate pe fundul oceanului formează roci sedimentare. Fiind foarte rezistente, se fosilizează. In anumite condiţii geologice, depozitele de cochilii ale foraminiferelor se pot transforma în cretă. Foraminiferele fosile sunt foarte utile pentru geologi, în vederea evaluării vârstei rocilor de calcar. Depozitele de foaminifere sunt utile pentru prospecţiunile geologice petroliere. Piramidele de lângă Cairo au fost construite din depozite de calcar de foraminifere.

Amoeba proteus este un protozoar de apă dulce, cu lungimea de 300 μm. Are un nucleu mare, fapt care a uşurat studiile de enucleare şi înlocuire cu nucleul altei amoebe.

O largă varietate de amoebe este parazită la om şi la alte vertebrate, cu localizare în cavitatea orală sau în tractul intestinal.

Entamoeba histolytica este parazită în tractul intestinal uman. In multe cazuri, infecţia nu produce simptome evidente, dar la unii indivizi produce ulceraţii ale tractului intestinal, însoţite de diaree. Starea patologică provocată de infecţie se numeşte *dizenterie amoebiană*. Maladia este răspândită în toată lumea, dar prevalează în regiunile geografice cu condiţii sanitare precare.

Parazitul este transmis de la un organism la altul, sub formă de *chist*, prin contaminarea fecală a apei şi a alimentelor. Odată ajunşi în intestin, din chişti se eliberează *trofozoiţi*. Aceştia se hrănesc cu secreţia mucoasă şi cu bacterii. De aceea se dezvoltă numai la organismele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

convenţionale şi nu la cele *germ free*. Trofozoiţii, prin creştere, devin amoebe, care cresc şi se divid prin fisiune binară. Amoebele produc enzime proteolitice, care lezează mucoasa intestinală. Astfel, amoebele pătrund în grosimea peretelui intestinal, unde invadează vasele sanguine. Pe cale portală ajung în ficat, dar şi în alte organe. Amoebele se multiplică şi produc abcese tisulare.

Amoebele produc un efect iritant asupra celulelor mucoasei intestinale. Se intensifică peristaltismul şi secreţia de fluid intestinal. Diareea, uneori saguinolentă, datorată leziunilor mucoasei, este simptomul dizenteriei amoebiene. In fluidul diareic, pe o lamă de microscop încălzită la 35-37° se observă trofozoiţii mobili, cu diametrul de 20-40 μm. La examenul fecal, trofozoiţii nu se observă, dar chiştii sunt prezenţi. La trecerea prin intestinul gros, prin două diviziuni succesive, chiştii formează 4 nuclei şi sunt infecţioşi pentru gazda următoare. Chiştii se identifică prin examenul direct al fecalelor persoanelor infectate. Dacă sunt în număr prea mic, se pot detecta după concentrare, prin diferite metode.

E. histolytica creşte anaerob în culturi pure sau aerob în medii lichide care conţin bacterii. Amestecul mai multor specii de bacterii favorizează creşterea amoebei. *E. histolytica* produce puţine leziuni, dar acestea lipsesc la animalele *germ free*.

Antibioticele care inhibă dezvoltarea bacteriilor intestinale sunt eficiente faţă de infecţia amoebiană, chiar dacă nu au efect direct asupra amoebelor. Aceasta denotă dependenţa amoebei de populaţia bacteriană intestinală, pe seama căreia se hrăneşte şi chiar existenţa unui sinergism al amoebei şi bacteriilor pentru producerea dizenteriei amoebiene.

Sporozoa

Sporozoarele sunt un grup mare de protozoare, toate parazite obligate, unele pentru o singură gazdă, altele pentru două, în ciclul lor infecţios în care se succed tipuri morfologice şi fiziologice distincte.

Sporozoarele nu au organite de locomoţie, deşi unele formează pseudopode, iar uneori, gameţii au mobilitate flagelară.

Modul de nutriţie este particular: hrana nu este ingerată, ci este absorbită în formă solubilă, prin învelişul extern, ca la bacterii şi fungi.

Denumirea de "sporozoare" presupune formarea sporilor în ciclul de viaţă. Totuşi, nu formează spori adevăraţi de tipul celor fungici, ci numai structuri analoge denumite *sporozoiţi*, implicaţi în transmiterea la un nou tip de gazdă.

Gazdele sporozoarelor sunt specii de nevertebrate, dar mai ales vertebrate. Unele prezintă o alternanţă obligatorie a gazdelor, deoarece unele stadii ale ciclului se desfăşoară la o gazdă, iar alte stadii au loc în organismul altei specii de gazdă.

Cei mai importanţi membri ai grupului sunt *coccidiile*, parazite la păsări şi *plasmodiile* (agenţii malariei), infecţioase pentru păsări şi mamifere, inclusiv pentru om.

Plasmodium. Omul este infectat de 4 specii de *Plasmodium* care produc malaria: *P. vivax, P. falciparum, P. malariae, P. ovale*. Toate necesită o alternanţă de gazde, om-ţânţar. Speciile de *Plasmodium* diferă morfologic, prin unele aspecte ale ciclului de viaţă şi prin severitatea malariei.

Cel mai răspândit este *P. vivax*. Parazitul îşi desfăşoară o parte a ciclului de viaţă la om şi alta la ţânţar, vectorul care-l transmite de la om la om. Sunt implicaţi numai ţânţarii din g. *Anopheles*. Malaria este o boală infecţioasă, foarte frecventă în zonele tropicală şi subtropicală. Cea mai caracteristică trăsătură a malariei este reacţia febrilă paroxistică, la intervale de 1-3 zile, care alternează cu stări fiziologice normale.

Omul este infectat prin înţepătura femelei de ţânţar, care îşi inseră trompa direct într-un capilar sanguin, unde inoculează *sporozoiţii*. Sporozoiţii plasmodiali sunt celule alungite care se formează în organismul ţânţarului şi care se localizează în glanda salivară a insectei.

După inocularea în gazda umană, prin înţepătură, parazitul malariei este transportat în ficat unde părăseşte circulaţia şi infectează celulele hepatice. Sporozoiţii sunt transportaţi cu torentul sanguin în tot organismul, dar sunt reţinuţi de celulele sistemului fagocitar mononuclear din ficat, splină şi din ganglionii limfatici. In ficat, sporozoitul creşte şi se transformă în *schizont*. Schizontul se fragmentează în mii de celule fiice mici, denumite *merozoiţi*, care sunt eliberaţi din ficat în sânge.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

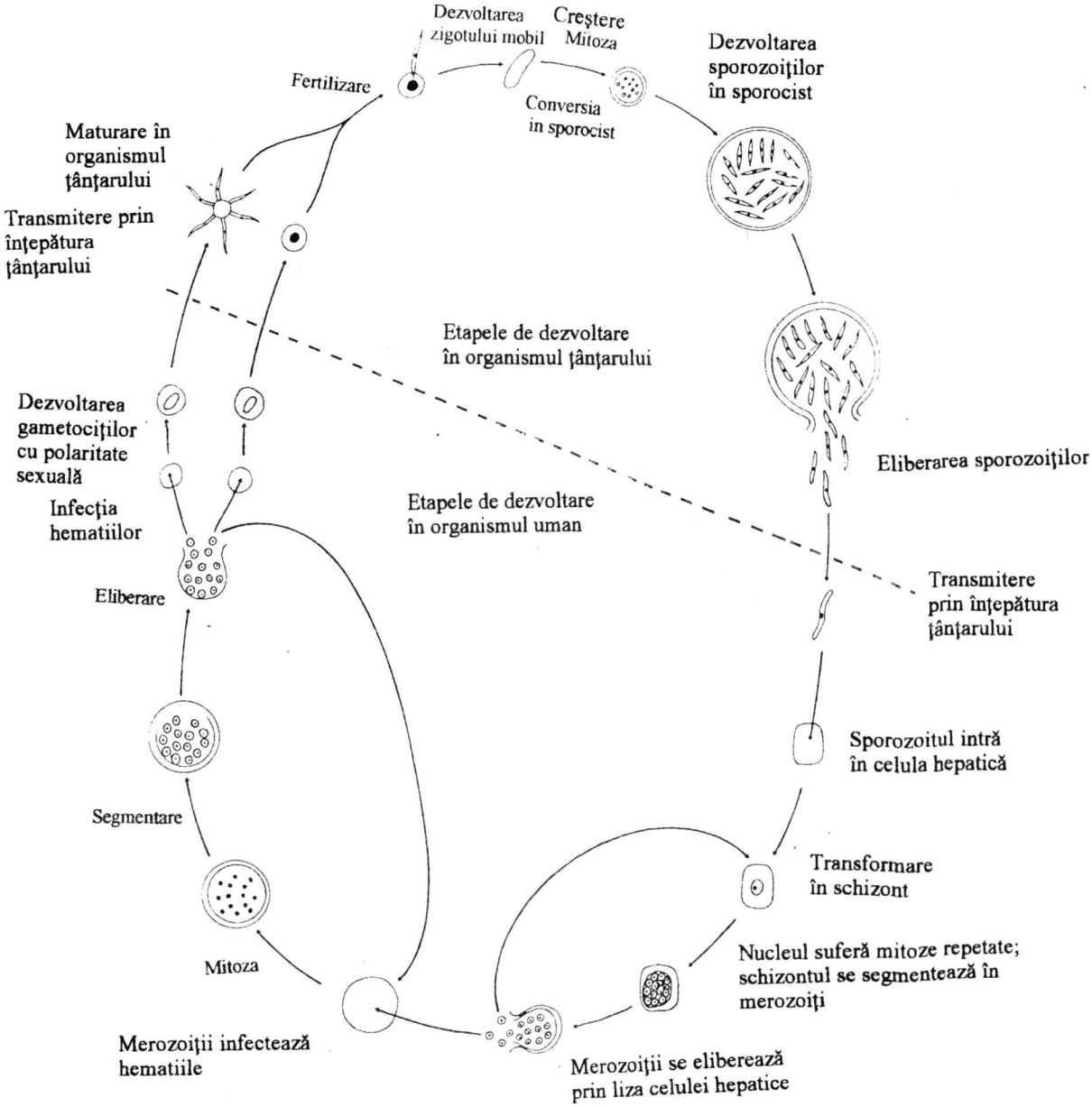


Fig. 242. Ciclul de viaţă al sporozoarului *Plasmodium vivax*, agentul malariei.

Unele specii de *Plasmodium* reiau ciclul de multiplicare hepatică, unde produc o infecţie persistentă, de lungă durată, rezistentă la tratamentul infecţiei sanguine şi care se reactivează după întreruperea tratamentului.

Merozoiţii infectează hematiile, iniţiind stadiul de *schizont eritrocitar*. La *P. vivax*, ciclul multiplicării în hematie şi liza ei durează 48 de ore. Stadiul multiplicării eritrocitare este însoţit de simptomele alternante de febră şi frig. Senzaţia de frig apare când din eritrocite se eliberează o nouă generaţie de paraziţi.

Cele mai multe plasmodii tinere, eliberate din eritrocitul lizat, reiau ciclul infecţios în noi eritrocite. O parte din plasmodiile eliberate din eritrocite nu pot să infecteze alte eritrocite. Ele sunt celule specializate denumite *gametocite* şi sunt infecţioase numai pentru ţânţar. Gametocitele sunt celule sexuate care se deosebesc de celulele vegetative, atât ca aspect cât şi ca sensibilitate la medicamentele antimalarice. Nu se dezvoltă în organismul uman şi nu au importanţă pentru producerea simptomelor malariei.

Gametocitele sunt ingerate de *Anopheles* odată cu sângele, prin înţepătură. Infecţia ţânţarului începe odată cu ingestia celulelor sexuate ale parazitului. Gametocitele se maturează şi rezultă *gameţi* masculi şi femeli. Doi gameţi cu polaritate sexuală opusă fuzionează şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

formează un *zigot*, care se deplasează prin mişcare amoeboidală în peretele intestinului mijlociu al ţânţarului. Aici zigotul devine *chist* de reproducere, care creşte progresiv prin diviziuni celulare. Una din diviziuni este *meiotică* şi se formează un număr mare de celule asexuate, denumite *sporozoiţi*. Aceştia sunt eliberaţi, ajung în glanda salivară a ţânţarului, de unde sunt inoculaţi la o nouă gazdă umană. Infecţia plasmodială a ţânţarului nu interferă cu funcţiile fiziologice ale insectei, ceea ce denotă că raporturile lor sunt vechi şi în evoluţie s-a produs o selecţie a variantelor de *Plasmodium*, capabile să conviețuiască cu insecta. La om însă, malaria este o boală gravă, uneori mortală.

Plasmodium nu a fost cultivat pe medii artificiale. Studiile s-au făcut pe stadiul infecţios eritrocitar. Hematiile infectate pot fi separate din sânge şi pot fi incubate *in vitro*, în condiţii care permit multiplicarea parazitului. Parazitul are propriul sistem enzimatic generator de energie. Nu sintetizează CoA, pe care o preia din eritrocit. Sintetizează acidul folic, dacă este disponibil precursorul acestuia, acidul para-amino-benzoic. Pentru sinteza proteinelor proprii, parazitul foloseşte aminoacizii derivaţi din hemoglobină, cea mai abundentă proteină eritrocitară (circa 90%). Hemoglobina este endocitată prin pinocitoză şi este hidrolizată la amnoacizi. Hematia mamiferelor nu conţine ADN, ci numai mici cantităţi de ARN, ceea ce denotă că, probabil, parazitul sintetizează bazele purinice şi pirimidinice, pornind de la aminoacizi. Probabil că permeabilitatea foarte mare a membranei celulare, permite preluarea unor molecule mari din eritrocit. Permeabilitatea crescută, determină pierderea rapidă a macromoleculelor în mediul extracelular, ceea ce explică parazitismul său obligat şi imposibilitatea de a creşte pe medii artificiale.

Probabil există diferenţe fiziologice între stadiul infecţios pentru eritrocite şi cel infecţios pentru ficat. Schizontul eritrocitar pare adaptat să utilizeze numai hemoglobina ca sursă de aminoacizi.

In zonele calde ale globului, unde ţânţarii sunt numeroşi, malaria este o infecţie endemică. In aceste regiuni, indivizii umani dobândesc rezistenţă la infecţia cu *Plasmodium*. In Africa de Vest, rezistenţa la malaria cauzată de *P. falciparum* este asociată cu prezenţa în hematii, a hemoglobinei S, care diferă de hemoglobina A, printr-un singur aminoacid în cele două jumătăţi simetrice ale moleculei. In hemoglobina S, aminoacidul neutru *valina* este înlocuit cu un aminoacid acid, *acidul glutamic*. Hemoglobina S are afinitate scăzută pentru O_2, ceea ce creează condiţii nefavorabile pentru *Plasmodium*, care are un metabolism strict aerob şi nu se dezvoltă la fel de bine în hematiile S, ca în hematiile cu hemoglobină normală A. Corelat cu afinitatea mai mică a hemoglobinei S faţă de O_2 este faptul ca indivizii suportă greu altitudinile mari, la care presiunea O_2 este mai mică, dar în regiunile joase, dezavantajul creat de hemoglobina S nu este evident. ,

In unele regiuni mediteraneene, unde malaria este endemică, rezistenţa la *P. falciparum* este asociată cu deficienţa în hematii, a enzimei glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza.

Pe baza corelaţiilor dintre tipul de hemoglobină şi gradul de sensibilitate la infecţia cu *Plasmodium*, se consideră că parazitul malariei a fost unul dintre factorii importanţi în evoluţia sub raport biochimic a speciei umane.

Un alt sporozoar cu un ciclu complex de viaţă este *Toxoplasma gondii*, agentul toxoplasmozei la păsări şi mamifere, la care a produs epidemii cu pierderi economice importante.

T. gondii infectează celulele mucoasei intestinale ale pisicii. Procentul pisicilor infectate pare să fie foarte mare (circa 50%). Alte animale sau omul se infectează prin ingestia hranei sau apei, contaminată cu fecalele animalelor infectate. Parazitul străbate peretele intestinal şi pe cale sanguină ajunge în ţesuturile gazdei (vacă, oaie etc.) unde se dezvoltă într-o formă chistică, în care prin diviziune, rezultă multe celule progene infecţioase. Ele rămân viabile pentru o perioadă nedefinită şi sunt transmise la om, prin ingestia cărnii insuficient pregătită. Studiile epidemiologice au arătat că persoanele care trăiesc în contact cu pisica au o incidenţă mai mare a toxoplasmozei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ciliatele sunt protozoare care se caracterizează prin prezenţa cililor pe suprafaţa întregii celule sau numai în zone spcializate ale ei. Din punct de vedere structural şi funcţional, celulele ciliatelor sunt printre cele mai complexe şi specializate din lumea vie, deoarece posedă organite ce realizează funcţii vitale particulare, de ingestie a hranei, de eliminare a resturilor indigeste, de menţinere a echilibrului osmotic, de mişcare, de recepţie a stimulilor etc.

Cele circa 6 000 de specii sunt împărţite în două grupe:

- cele care au cili numai pe o zonă a suprafeţei celulare (*Stentor*);
- cele care au cili distribuiţi pe toată suprafaţa celulei (*Paramecium*).

Ciliatele sunt foarte răspândite în apele dulci, iar parameciul este abundent în apele stătătoare.

Ciliatele sunt unice printre protozoare, deoarece au doi nuclei: *micronucleul*, cu rol de a transmite caracterele ereditare şi pentru realizarea fenomenului de sexualitate; *macronucleul*, care nu are rol în transmiterea caracterelor ereditare, dar codifică sinteza ARNm şi coordonează toate funcţiile celulei*.

Majoritatea ciliatelor se hrănesc, ingerând materiale particulate printr-o regiune diferenţiată, denumită *citostom*. In jurul regiunii orale se găsesc cili, care prin mişcarea lor coordonată, creează un curent al apei ce deplasează particulele alimentare spre orificiul oral. Citostomul se închide şi se deschide, ca răspuns la absenţa sau prezenţa particulelor alimentare. Particula alimentară este transportată prin citofaringe, în citoplasmă, unde este închisă într-un sistem membranar şi se formează o *vacuolă digestivă*, în interiorul căreia se eliberează enzimele hidrolitice.

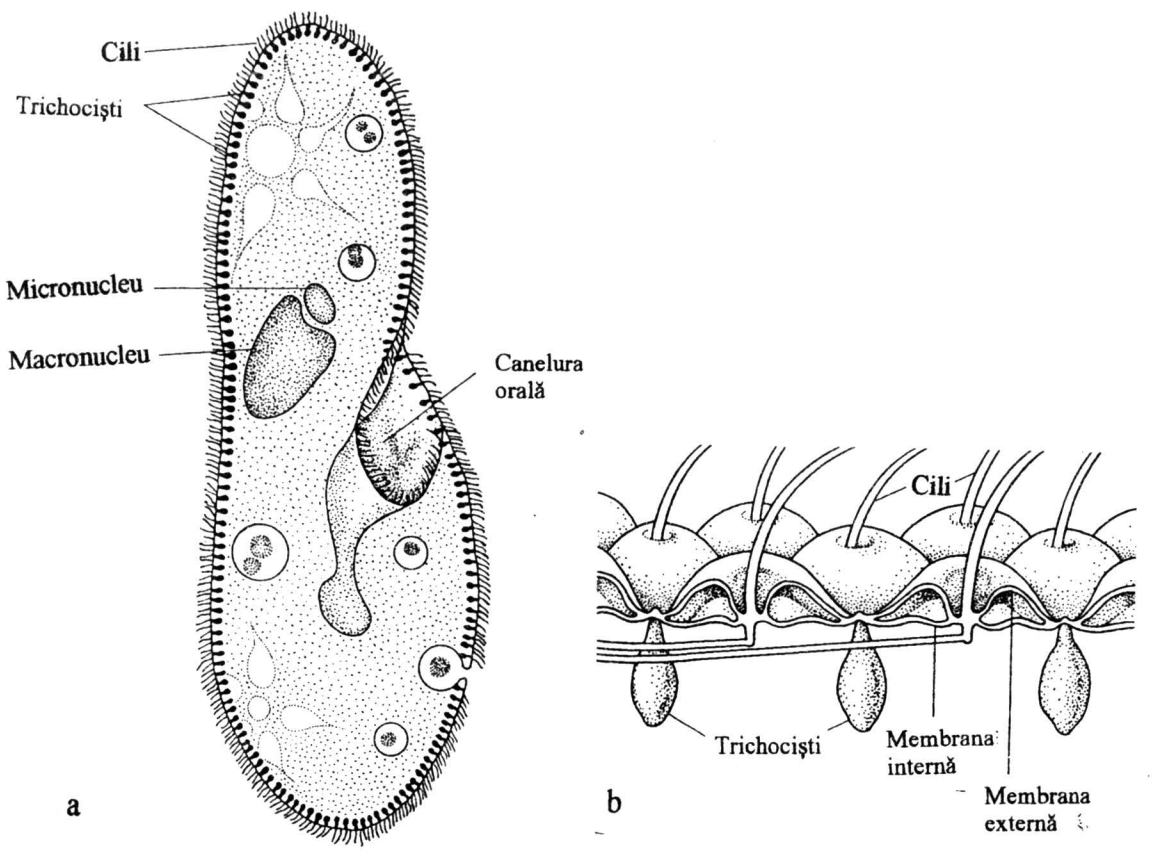


Fig. 243. a. Organizarea celulară la *Paramecium*. b. Numeroşi cili emerg prin membrana internă şi externă a peliculei. În repaus, trichocistii sunt localizaţi sub peliculă.

* Macronucleul este poliploid, având multe copii ale informaţiei genetice a celulei. Conţine de circa 500 de ori mai mult ADN decât micronucleul. La unele cilitate, macronucleii sunt multipli.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Vacuola digestivă este delimitată de o membrană externă foarte fină şi este transportată intracelular, prin curenţi citoplasmatici. Vacuola digestivă se opreşte totdeauna un interval de timp, în apropierea nucleului. Conţinutul vacuolei are, iniţial, o reacţie acidă. Odată cu progresia digestiei, conţinutul devine alcalin, prin hidroliza componentelor proteice. Conţinutul vacuolei se pierde în regiunea porului anal, unde are loc excreţia produselor de uzură. Produsele de catabolism (apă, CO_2, uree etc.) sunt eliminate la suprafaţa celulei, printr-o structură specializată, denumită *vacuolă contractilă*, o structură permanentă sau temporară.

Un alt organit specializat al ciliatelor este *trichocistul*, o structură filamentoasă, subţire, ancorată sub învelişul celular şi se formează dintr-o grupare de cili. El poate fi proiectat sau retractat şi serveşte ca mijloc de ancorare, armă de apărare sau instrument de captare a prăzii. La *Didinium*, un ciliat prădător, trichocistul paralizează prada, înainte de a o ingera.

Ciliatele se deosebesc net de alte protozoare, prin prezenţa celor două tipuri de nuclei: micronucleul diploid şi macronucleul poliploid. Micronucleul nu are rol direct în creşterea şi diviziunea celulei. Celula fără micronucleu continuă să crească şi să se dividă. După îndepărtarea macronucleului, celula moare repede. După excizia unei părţi a macronucleului, fragmentul rămas, regenerează macronucleul întreg.

La ciliate se produc două feluri de fenomene nucleare: *autogamia* şi *amfimixia*.

In procesul de *autogamie* are loc reorganizarea nucleară, în absenţa proceselor sexuale. Semnificaţia fiziologică a procesului este prevenirea senescenţei şi constă în regenerarea aparatului nuclear, fără conjugare. Macronucleul degenerează, iar micronucleul se divide repetat şi se organizează un alt macronucleu. Ca rezultat al autogamiei, celula devine homozigotă, deoarece toate genele ambilor tipuri de nuclei provin din micronucleul haploid. Datorită repetării autogamiei pentru mai multe generaţii, se produce senescenţa (îmbătrânirea) populaţiei celulare, prin pierderea capacităţii macronucleului de a funcţiona. Rata diviziunii scade treptat şi chiar încetează.

Al II-lea fenomen nuclear, care are loc la ciliate este *amfimixia* şi implică conjugarea între două celule ce aparţin unor "tipuri sexuale" diferite. Fecundarea nu se produce între indivizii descendenţi din aceiaşi celulă parentală.

Procesul conjugării este precedat de recunoaşterea celor doi parteneri şi implică aderenţa reciprocă în zona citostomului şi realizarea unei punţi de legătură între cele două celule. Macronucleul degenerează treptat, iar micronucleul suferă modificări ample, de-a lungul unei serii de diviziuni succesive. Prima diviziune este mitotică. Cea de a II-a este meiotică şi produce 4 micronuclei haploizi. Din cei 4, trei degenerează. Cel care rămâne, se divide şi rezultă doi *micronuclei de fecundaţie* sau *pronuclei*. Aceste evenimente se produc simultan în cele două celule conjugante. Are loc un schimb reciproc de pronuclei haploizi. Micronucleul exogen fuzionează cu cel autohton şi rezultă un nucleu diploid, a cărei informaţie genetică provine, în egală măsură, din cele două celule conjugante. După schimbul de nuclei, celulele se separă. Nucleul diploid se divide şi rezultă doi micronuclei. Unul rămâne *micronucleu diploid*, iar celălalt se măreşte progresiv prin *endomitoze* succesive, îşi măreşte numărul de cromosomi şi atinge un grad înalt de poliploidie. Rezultatul net al conjugării este formarea exconjuganţilor, care sunt hibrizi pentru genele celor doi conjuganţi.

Conjugarea nu este o modalitate de multiplicare, ci este o cale de reînoire parţială a garniturii de cromosomi.

Multe linii de *Paramecium* (dar şi alte protozoare) conţin alge sau bacterii endosimbiotice, localizate în citoplasmă sau în macronucleu. De exemplu, la *P. bursaria*, în citoplasmă, se găseşte alga *Chlorella*. In acest raport simbiotic, alga este protejată, iar protozoarul beneficiază de produsele fotosintezei algale. Simbionţii algali ai protozoarelor de apă dulce se numesc *zooclorele* şi au culoare verde, iar ai protozoarelor marine au culoare galbenă sau cafenie şi se numesc *zooxantele*.

Paramecii au o varietate de endosimbionţi de natură bacteriană. *P. aurelia* conţine celule bacteriene cunoscute sub denumirea de particule *kappa*. Endosimbiontul secretă o substanţă toxică, ce produce efect litic asupra paramecilor sensibili, lipsiţi de particulele endosimbionte bacteriene şi de aceea au fost denumiţi parameci *killer*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Alt exemplu de endosimbiont bacterian, este particula *lambda*, care a fost cultivată şi este un bacil Gram negativ.

Rolul bacteriilor, algelor şi fungilor endosimbiotici este incert, dar există dovezi că endosimbionţii au rol nutritiv pentru că sintetizează vitamine şi alţi factori de creştere pe care protozoarele nu-i pot sintetiza şi necesită aportul lor exogen.

Unul dintre cele mai mari ciliate este *Stentor*, cu lungimea de 1 mm, vizibil cu ochiul liber. Este sesil, fixat pe substrat prin intermediul unui peduncul. Deschiderea citofaringelui este tapetată cu un şir de cili, care prin mişcare ordonată, orientează hrana din curentul de apă, spre citofaringe.

Diviziunea celulei este un proces complex. In timpul diviziunii, una din celule păstrează citofaringele matern şi formează un nou crampon, iar cealaltă formează un citofaringe nou şi păstrează cramponul vechi.

Opalina ranarum este un ciliat parazit în intestinul unor broaşte. Diviziunea nucleului nu este sincronă cu diviziunea celulei, ci permanentă, pe toată durata creşterii celulei. Opalinele se deosebesc de ciliatele propriu-zise, prin aceea că au doi nuclei egali. Lipseşte micronucleul.

In compartimentul ruminal al rumegătoarelor, se găseşte o asociaţie diversificată şi caracteristică de ciliate, care au rol benefic în procesul digestiei masei vegetale şi în aprovizionarea organismului animal cu proteine.

Un alt grup de ciliate, cu morfologie distinctă este *Suctoria*. Celulele libere formează o parte a planctonului. Pe măsură ce se maturează, pierd cilii şi se fixează de suport printr-un peduncul sau un disc. Membrii grupului se găsesc în apa dulce şi sărată, fixaţi pe plante şi animale. Işi obţin hrana din ţesutul suport, prin aspiraţie, cu ajutorul unor tentacule protoplasmatice fine, care penetrează stratul protector al ţesutului gazdei. Se multiplică prin înmugurire.

Foarte puţine ciliate sunt *parazite* la om şi animale. *Balantidium coli* este parazit la animalele domestice, dar infectează tractul intestinal uman. Simptomele produse sunt similare cu cele cauzate de *E. histolytica*.

FUNGII

Fungii sunt organisme heterotrofe. Asemenea majorităţii bacteriilor şi organismelor animale, fungii folosesc substanţele organice, ca sursă de energie. Nu conţin pigmenţi fotosintetizanţi, ci pentru producerea energiei sunt dependente de sisteme enzimatice specifice.

Fungii pot fi organisme *saprobionte*, adică cresc pe materia organică în descompunere, de origine vegetală şi animală. Alţii sunt paraziţi şi preiau nutrienţii din ţesuturile organismelor vii, plante şi animale, prin intermediul unor hife specializate denumite *haustori*. In ambele cazuri, enzimele hidrolitice sunt eliberate din celula fungică în mediul înconjurator, unde moleculele nutritive sunt simplificate prin digestie enzimatică, iar nutrienţii trec în celula fungică, sub forma unei soluţii apoase.

Organizare celulară şi fiziologie

Celulă fungică este aemănătoare, din punct de vedere structural, cu cea vegetală sau animală. Nucleul celulei fungice este foarte mic. Invelişul nuclear dublu-membranar, adeseori, prezintă pori mari. In timpul mitozei, învelişul nu se dezorganizează, ci suferă o constricţie, ceea ce conferă nucleului, aspectul de halteră. In final se formează doi nuclei fii. Fusul de diviziune este intranuclear. Cromosomii au dimensiuni mici. In metafază, ei se distribuie întâmplător pe fibrele fusului şi nu formează o placă ecuatorială. In timpul diviziunii mitotice, nucleolul persistă.

In diviziunea meiotică, atât membrana nucleară, cât şi nucleolul se dezorganizează.

Vacuolele, totdeauna prezente în celula fungică, niciodată nu ating dimensiunea celor din celula vegetală.

Celula fungică depozitează glicogen sau lipide.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Peretele celular constă din microfibrile de chitină sau de celuloză. Majoritatea fungilor au perete chitinos. Uneori, chitina şi celuloza coexistă în compoziţia aceluiaşi perete.

Intre plasmalemă şi peretele celular, apar structuri speciale denumite *lomasomi*, alcătuiţi din agregate de tubuli sau din vezicule. Funcţia lor nu este cunoscută.

Compoziţia chimică a peretelui celular al levurilor este hetrogenă. El conţine cantităţi aproximativ egale de *glucan* (un polizaharid cu grad înalt de ramificare) şi *manan* (un polizaharid solubil). Alţi compuşi chimici ai peretelui fungic sunt lipidele, proteinele şi glucozamina (un glucid aminat).

Studiul suprafeţei fungilor este important, deoarece la acest nivel se găsesc structurile moleculare care realizează interacţiunile celulare în cursul reproducerii sexuate, în procesul floculării levurilor de fermentaţie, în înglobarea şi excreţia moleculelor. Studiile ultrastructurale au evidenţiat, pe suprafaţa diferitelor levuri, prezenţa *fimbriilor*, cărora li se atribuie un rol important în etapa iniţială a procesului de reproducere sexuată.

Unitatea structurală a aparatului vegetativ al fungilor este, de regulă, *hifa*. Pe măsură ce creşte, hifa se ramifică într-o reţea densă de hife, care constituie *miceliul* vizibil ca o pâslă fină. Fungii macroscopici sunt alcătuiţi din hife împachetate într-o structură denumită *corp de fructificare*. Miceliul este analog coloniei bacteriene.

Hifele sunt alcătuite din celule. Celulele fungice pot avea dimensiuni diferite: uneori o singură celulă formează întregul aparat vegetativ al fungilor. In această categorie intră levurile monocelulare.

Celulele fungice pot fi alungite şi filiforme, mononucleate sau binucleate. La *Zygomycetes*, hifele sunt *coenocitice* (neseptate), adică după diviziunea nucleului, pereţii despărţitori nu se formează şi conţinutul hifei se poate deplasa liber pe lungimea filamentului. La alţi fungi, hifele miceliene sunt divizate prin pereţi transversali (septe). Adeseori, septurile transversale sunt perforate de unul sau mai mulţi pori mici, care permit citoplasmei şi nucleilor să treacă dintr-o celulă în alta.

Miceliul prezintă diferenţieri funcţionale. Aproape toţi fungii prezintă *miceliul vegetativ*, care creşte în grosimea substratului şi are rol absorbant al substanţelor nutritive. Unele specii prezintă structuri specializate denumite *rizoizi*, care absorb nutrienţii, dar au şi rol de fixare. Miceliul care creşte deasupra substratului este *miceliul aerian*, pe care se dezvoltă structurile cu rol reproducător. Cele două tipuri de miceliu pot să se dezvolte simultan, formând un aparat vegetativ unitar, sau apariţia lor este decalată în timp. Miceliul asimilator este bine dezvoltat şi pătrunde adânc în substrat. Structurile reproducătoare sunt totdeauna aeriene şi pot fi microscopice sau macroscopice. La levuri, aceiaşi celulă îndeplineşte ambele funcţii.

Dimorfismul fungic. Câţiva fungi patogeni prezintă un dimorfism evident, adică două aspecte morfologice distincte, în condiţii diferite de mediu. Pe medii nutritive, aceste organisme manifestă tipul morfologic normal, caracteristic nutriţiei saprobionte, dar în ţesuturile animale sau pe medii foarte bogate în substanţe nutritive, la temperaturi superioare, aparatul vegetativ are caracteristicile unei levuri. Denumirea de "saprobiontă" se foloseşte pentru varianta morfologică de *mucegai*, iar cea de "parazitară" se foloseşte pentru stadiul de *levură*.

Reproducerea

Fungii se reproduc pe cale sexuată şi asexuată. Cele două căi nu sunt comune tuturor fungilor, deoarece unele grupe se reproduc numai pe cale asexuată.

Unitatea structurală de reproducere, tipică pentru fungi este *sporul*, care poate avea unul sau mai mulţi nuclei. Sporii, sexuaţi sau asexuaţi sunt produşi pe hife, în interiorul lor sau în structuri specializate. La fungii macroscopici se formează structuri reproducătoare multicelulare ce poartă spori, denumite *sporocarpi*.

Sporul este o structură ce poate fi separată de talul parental şi astfel este diseminat.

Tipul de spori produşi şi modalitatea de sporulare sunt criterii importante pentru clasificarea fungilor. In general, sporii sexuaţi nu sunt mai termorezistenţi decât celulele vegetative.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reproducerea sexuată poate să fie rezultatul unirii hifelor, a celulelor sexuale diferenţiate (gameţi), a unor structuri multinucleate cu polaritate sexuală denumite *gametangii* sau a unui gametangiu femel cu un gamet mascul imobil.

Toate aceste structuri reproducătoare au nuclei cu un set haploid de cromosomi. Unirea elementelor reproducătoare mascule şi femele realizează într-o prima etapă, fenomenul de *plasmogamie*, ce semnifică unirea maselor citoplasmatice, dar cei doi nuclei haploizi rămân separaţi şi realizează stadiul de celulă *dicariotică*. Faza dicariotică este, probabil, prezentă la toate organismele care se reproduc sexuat, dar uneori are o durată foarte scurtă.

La majoritatea fungilor superiori (Bazidiomicete), faza dicariotică se extinde pe cea mai mare parte a ciclului de viaţă şi se prelungeşte mai multe generaţii celulare, timp în care reproducerea se face numai pe cale asexuată.

Când cei doi nuclei (mascul şi femel) fuzionează în procesul de cariogamie, rezultă un *zigot diploid*, la care prima diviziune este meiotică şi se formează sporii sexuaţi haploizi. Aşadar, formarea sporilor sexuaţi este precedată de fuziunea nucleară şi de diviziunea meiotică. Celulele sporale formate pe cale sexuată se numesc *ascospori, bazidiospori, oospori* şi *zigospori*. Sporii sexuaţi se formează cu o frecvenţă mai mică decât cei asexuaţi.

Sporularea sexuată este indusă în condiţii speciale de mediu.

Ascosporii se formează în celule saciforme, denumite *asce*, după fuziunea citoplasmatică şi nucleară a celulelor polarizate sexual. Sporii sunt structuri individualizate, de obicei în număr de 8 pentru o ască, sferici sau ovali, nerezistenţi la factorii de mediu.

Bazidiosporii se formează la capătul unor structuri dilatate, denumite *bazidii*. Sunt solitari, sferici sau ovali, în număr de 4, fără proprietăţi de rezistenţă (de exemplu, la *Amanita, Agaricus, Coprinus*).

Oosporii se dezvoltă într-o celulă ou, denumită *oogonie*. Sunt sferici, în număr de 1-20 într-o oogonie, mai rezistenţi decât majoritatea sporilor asexuaţi (de exemplu, la *Saprolegnia*).

Zigosporii sunt mari, cu pereţi groşi, sferici sau ovali, nerezistenţi. Se formează un singur zigospor (de exemplu, la *Rhizopus*).

Sporii asexuaţi. Unele grupe de fungi produc atât spori sexuaţi cât şi asexuaţi, iar altele produc numai spori asexuaţi. Formarea sporilor asexuaţi poate avea loc în faza haploidă, în faza dicariotică sau în faza diploidă a ciclului sexual. Spre deosebire de sporii sexuaţi, sporii asexuaţi nu sunt niciodată precedaţi de diviziunea meiotică.

Sporii asexuaţi includ o diversitate de structuri, cu denumiri diferite în funcţie de modalitatea de formare: artrospori, blastospori, clamidospori, conidii, sporangiospori, zoospori.

Unele grupe de fungi au capacitatea de a forma două tipuri de spori asexuaţi. Sporii asexuaţi diferă prin aspectul morfologic şi dimensiuni, culoare, prin numărul de nuclei.

Artrosporii se formează prin fragmentarea hifelor şi au formă cilindrică sau sferică. Nu sunt rezistenţi la acţiunea factorilor de mediu. Sunt definitorii pentru genurile *Geotrichum, Trichosporon* etc.

Blastosporii se formează prin înmugurirea celulei principale. Au formă sferică sau ovalară şi sunt nerezistenţi. Sunt caracteristici pentru genurile *Candida, Saccharomyces* etc.

Clamidosporii se formează prin dilatarea celulelor terminale sau intercalare ale hifei. Sunt solitari, sferici, au pereţi groşi şi foarte rezistenţi la uscăciune şi căldură. Se diferenţiază la *Candida, Mucor* etc.

Conidia se formează ca o structură solitară sau în şiruri moniliforme pe hife specializate, denumite conidiofori. Au formă sferică sau ovoidă şi nu sunt rezistenţi la factorul termic. Se diferenţiază la *Aspergillus, Penicillium* (şi se numesc microconidii) sau sunt multicelulari (macroconidii), lungi şi ascuţiţi, nerezistenţi (de exemplu, la *Alternaria, Trichophyton*).

Fialosporul (o conidie specială) se formează pe ramuri specializate ale conidioforilor, denumite *fialide*. Fialosporii sunt solitari sferici sau ovalari, nerezistenţi. Se diferenţiază la *Phialospora*.

Sporangiosporii se formează în interiorul unor celule dilatate, la capătul hifelor, denumite sporangi. Sunt sferici, nerezistenţi (de exemplu, *la Mucor, Rhizopus* etc.).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Zoosporii se formează în interiorul zoosporangilor, diferenţiaţi la capătul hifelor principale sau al ramificaţiilor laterale. Sunt sferici, nerezistenţi, dar caracterul lor distinctiv este mobilitatea prin flageli, de unde îşi iau şi denumirea. Se formează la fungii inferiori (de exemplu, la *Saprolegnia*).

Sporii produşi de fungii aquatici sunt mobili, iar cei produşi de fungii tereştri sunt înconjuraţi de pereţi mai groşi decât ai hifei. Peretele sporal este alcătuit din *epispor* şi *endospor*, care acoperă protoplastul sporal. Intreaga structură poate fi acoperită de *perispor*.

In condiţii favorabile de mediu (substanţe nutritive, umiditate, pH, temperatură), sporii fungici germinează şi produc una sau mai multe structuri filamentoase denumite *tuburi de germinare*. Ele emerg în zonele mai subţiri la învelişului sporal. Apoi cresc, se alungesc şi se ramifică pentru a forma hifele.

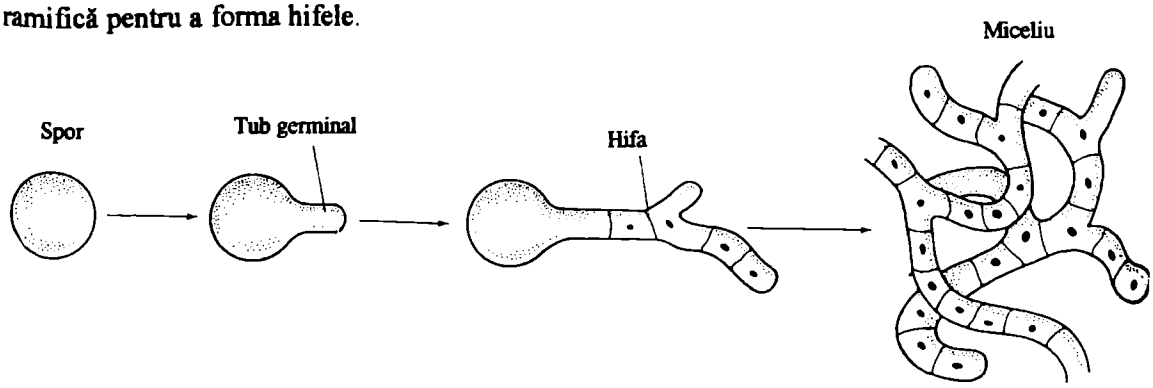


Fig. 244. Germinarea sporilor fungici. Iniţial se formează tubul de germinare, care creşte şi rezultă o hifă. Hifa creşte, se ramifică şi formează o pânză hifală, denumită miceliu.

Clasificare

Criteriile majore de clasificare a fungilor sunt următoarele:

- modul de reproducere;
- ciclul de viaţă
- morfologia organelor de reproducere şi a sporilor formaţi;
- particularităţi de ordin biochimic, fiziologic, determinări de ordin calitativ a asemănărilor şi deosebirilor dintre diferiţi reprezentanţi.

Fungii sunt consideraţi ca unitate taxonomică de sine stătătoare, cu rangul de *regn*: regnul *Fungi* (*Mycetae*), propus de Ainsworth (1973).

Fungii inferiori formează zoospori şi includ clasele *Oomycetes* şi *Chytridiomycetes*.

Fungii din diviziunea *Amastigomycota* nu produc zoospori şi sunt reprezentaţi de clasele: *Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes.*

Regnul *Fungi* cuprinde şi un grup de organisme cu particularităţi comune fungilor şi protozoarelor: *Mixomycete (Gymnomyxa).*

Fungii inferiori constituie un grup heterogen, care au fost reuniţi în două clase neînrudite: *Oomycetes* şi *Chytridiomycetes.*

Majoritatea fungilor inferiori trăiesc în mediul aquatic şi într-un anumit stadiu al ciclului de viaţă formează o celulă mobilă, denumită *zoospor*. La originea sa poate fi un proces sexuat sau unul asexuat. Zoosporul participant la un proces sexuat are funcţia unui gamet.

Zoosporii sunt mobili prin unul sau doi flageli. Flagelul este un apendice filiform, alcătuit din două fibre centrale şi 9 fibre periferice, contractile.

Zoosporii şi gameţii mobili se formează într-o structură în formă de sac, denumită *zoosporangiu*. Dacă zoosporul are rol de gamet, sacul se cheamă *gametangiu*.

Oomycetes

Oomycetes sau mucegaiurile de apă se deosebesc de fungii propriu-zişi, deoarece au pereţi celulozici. Cromosomii lor conţin proteine histonice, în timp ce fungii adevăraţi au histone puţine sau deloc. Un alt caracter distinctiv faţă de fungii propriu-zişi, constă în prezenţa

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

centriolului, absent la fungi. Reprezentanţii lor trăiesc mai ales în apă dulce. Unii sunt terestri. Cel mai reprezentativ este *Plasmopara viticola*, agentul manei la viţa de vie. Amestecul Bordeaux, format din $CuSO_4$ şi $Ca(OH)_2$ este foarte eficient pentru controlul acestei boli cu un potenţial distructiv uriaş.

Ciclul de reproducere include două stadii: sexuat şi asexuat. Sporii asexuaţi sunt biflagelaţi şi mobili. Gameţii sunt imobili şi prin fuziune generează zigotul 2n, denumit *oospor*.

Zygomycetes

Zygomycetes se caracterizează printr-un tip de reprodcere sexuată, în care două gametangii fuzionează şi formează un *zigot* (zigospor). Hifele au puţini pereţi transversali sau aceştia lipsesc complet, miceliul fiind de tip *coenocitic*.

Un reprezentant comun al grupului este *Rhizopus nigricans*, care creşte pe resturi alimentare, pe care le acoperă cu un miceliu de culoare închisă (mucegaiul negru). Unele hife se răspândesc orizontal pe suprafaţa substratului şi se numesc *stolonifere*. Din acestea se dezvoltă hife care penetrează substratul nutritiv, având rol în absorbţia nutrienţilor şi de fixare. La extremitatea unor hife care cresc vertical se formează o dilatare în formă de sac, denumită *sporangiu*. În fiecare sporangiu se dezvoltă o aglomerare de spori asexuaţi, care se eliberează prin ruperea peretelui sporangial.

Creşterea acestui mucegai în şi pe produsele de panificaţie este stopată prin adăugarea agenţilor inhibitori, la aluatul de creştere. Unele zigomycete produc infecţii la om şi animalele vertebrate. Altele parazitează viermii şi artropodele.

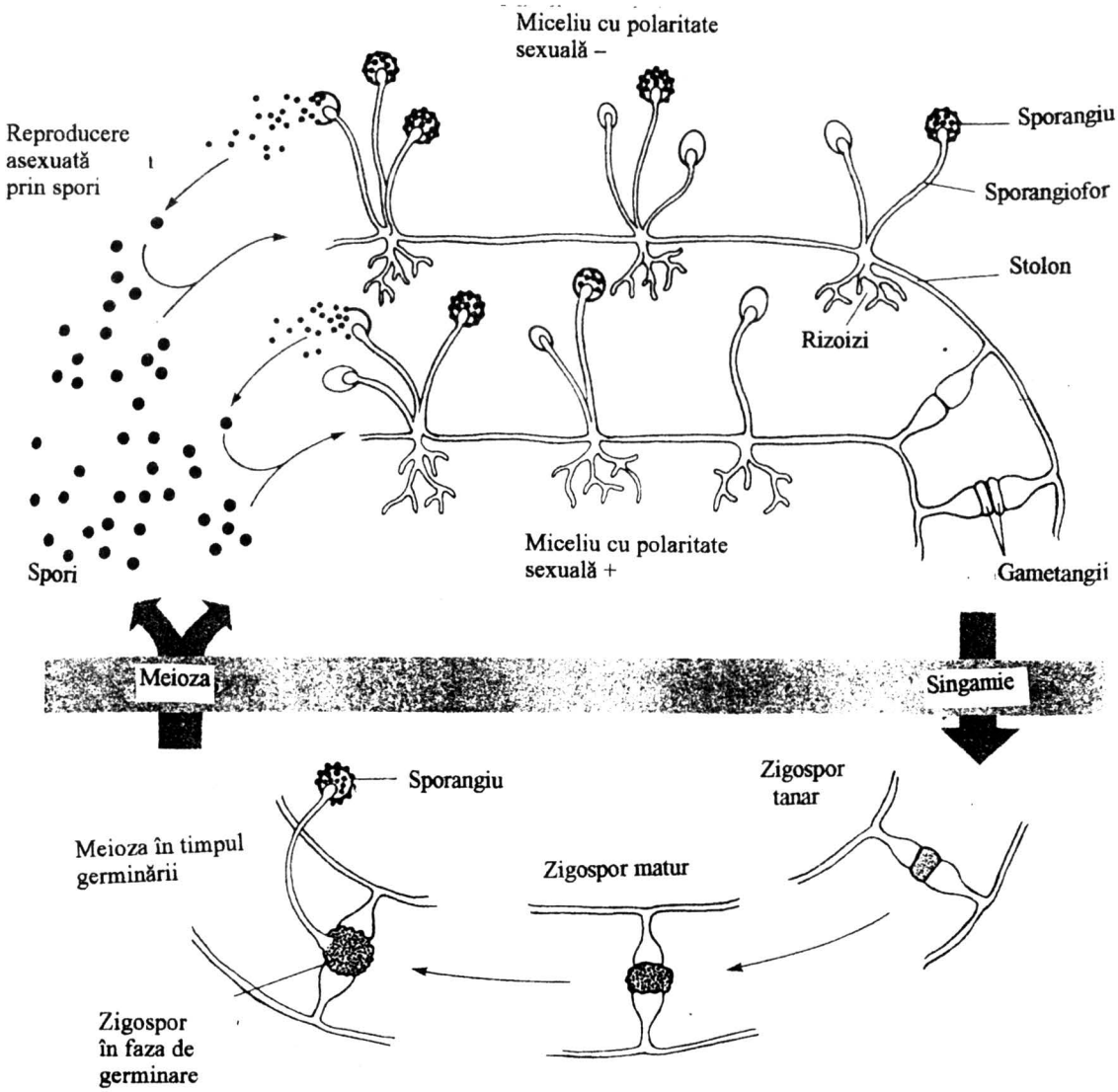


Fig. 245. Reproducerea sexuată şi asexuată la ***Rhizopus stolonifer*** (mucegaiul negru al pâinii).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

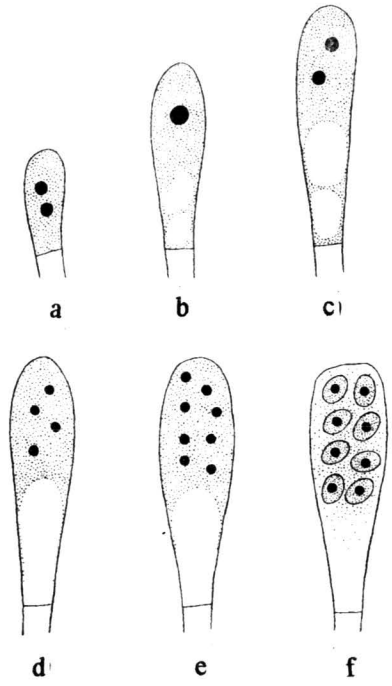


Fig. 246. Stadiile succesive ale formării ascei. a. Celula binucleată rezultată prin fuziunea celulelor haploide. b. Fuziunea nucleară. c, d, e. Diviziuni nucleare. f. Formarea ascosporilor

Ascomycetes

Ascomicetele formează cel mai mare şi diversificat grup de fungi, cu circa 2000 de genuri. Grupul include levurile, mucegaiurile care produc boli caracteristice la plante denumite *făinări* şi fungi cu pălărie: *Morchella* (zbârciogul) şi *Tuber* (trufele).

Majoritatea sunt terestre, dar un număr considerabil, populează apele dulci sau sărate. Majoritatea sunt saprobionte pe resturile vegetale în descompunere, iar unele sunt parazite sau trăiesc în asociaţii reciproc benefice, cu alte microorganisme sau cu unele plante.

Multe ascomicete saprofite sunt foarte specializate şi cresc numai pe anumite părţi în descompunere ale unor specii de plante, iar cele parazite sunt restrânse la anumite ţesuturi ale gazdei (de exemplu, peţiolul frunzei). Un număr important de reprezentanţi ai grupului sunt paraziţi ai plantelor şi mai puţini ai insectelor sau altor animale.

Ascomicetele se reproduc pe cale sexuată şi asexuată. Caracteristica acestui grup de fungi este că sporii sexuaţi, denumiţi *ascospori* se formează într-o structură în formă de sac, denumită *ască*.

Asca este o celulă care se formează prin procesul de fuziune a unor structuri tubulare a două celule învecinate haploide. Iniţial fuzionează numai masele citoplasmatice, prin procesul de *plasmogamie*. Plasmogamia poate fi rezultatul unirii a două celule similare sau hife, ori prin unirea heterogenă a două celule diferite, diferenţiate, denumite *gametangii*, unul mascul şi unul femel sau a unui gametangiu femel cu o celulă masculină detaşată (spermatie).

După plasmogamie, celula are două căi de evoluţie:

- cariogamia poate avea loc imediat după plasmogamie şi rezultă zigotul. Zigotul sau celulele rezultate prin diviziunea sa, se transformă în ască;

- cariogamia întârzie şi starea dicariotă, iniţiată prin procesul plasmogamiei, se prelungeşte pentru mai multe generaţii.

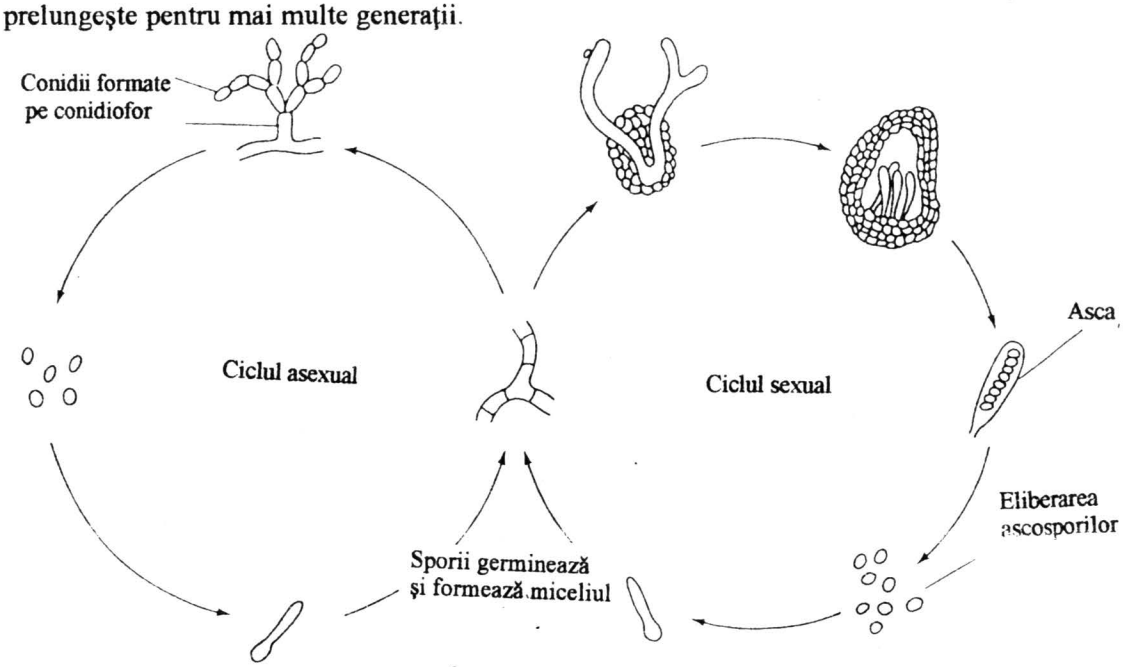


Fig. 247. Ciclul de viaţă la *Neurospora*. În ciclul sexuat, celulele de polaritate sexuală opusă fuzionează şi formează ascospori, închişi în ască.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În interiorul ascei, procesul generării ascosporilor este asemănător la toţi fungii. După cariogamia imediată sau tardivă, nucleul diploid al ascei, suferă diviziunea meiotică. După prima diviziune meiotică, se formează doi nuclei, iar după a II-a diviziune rezultă 4 nuclei. La cele mai multe ascomicete, urmează o diviziune mitotică şi se formează 8 nuclei. Cei 8 nuclei sunt încorporaţi în ascospori, delimitaţi de o membrană dublă. Membrana este originară în reticulul endoplasmic sau în învelişul nuclear. Ea se invaginează pentru a înconjura fiecare nucleu. Peretele sporal nou, este depus între cele două lame membranare. Membrana internă devine plasmalema sporului. Numărul ascosporilor poate fi numai de 4 dacă cea de a III-a diviziune nu mai are loc, sau de 16, 32 sau alt multiplu de 8, în funcţie de numărul diviziunilor mitotice care au loc. La unele ascomicete, ascele se pot forma în corpi de fructificaţie, denumiţi *ascocarpi*. Se cunosc patru tipuri de astfel de structuri: apotecia, cleistotecia, loculotecia şi peritecia.

Reproducerea asexuată este comună majorităţii ascomicetelor. Celulele de levuri se reproduc asexuat prin *înmugurire*. In acest proces, nucleul se divide prin mitoză, fără dezorganizarea membranei nucleare. Unul dintre cei doi nuclei, se deplasează într-o mică proiecţie a citoplasmei, delimitată de membrană şi perete, denumită *mugure*.

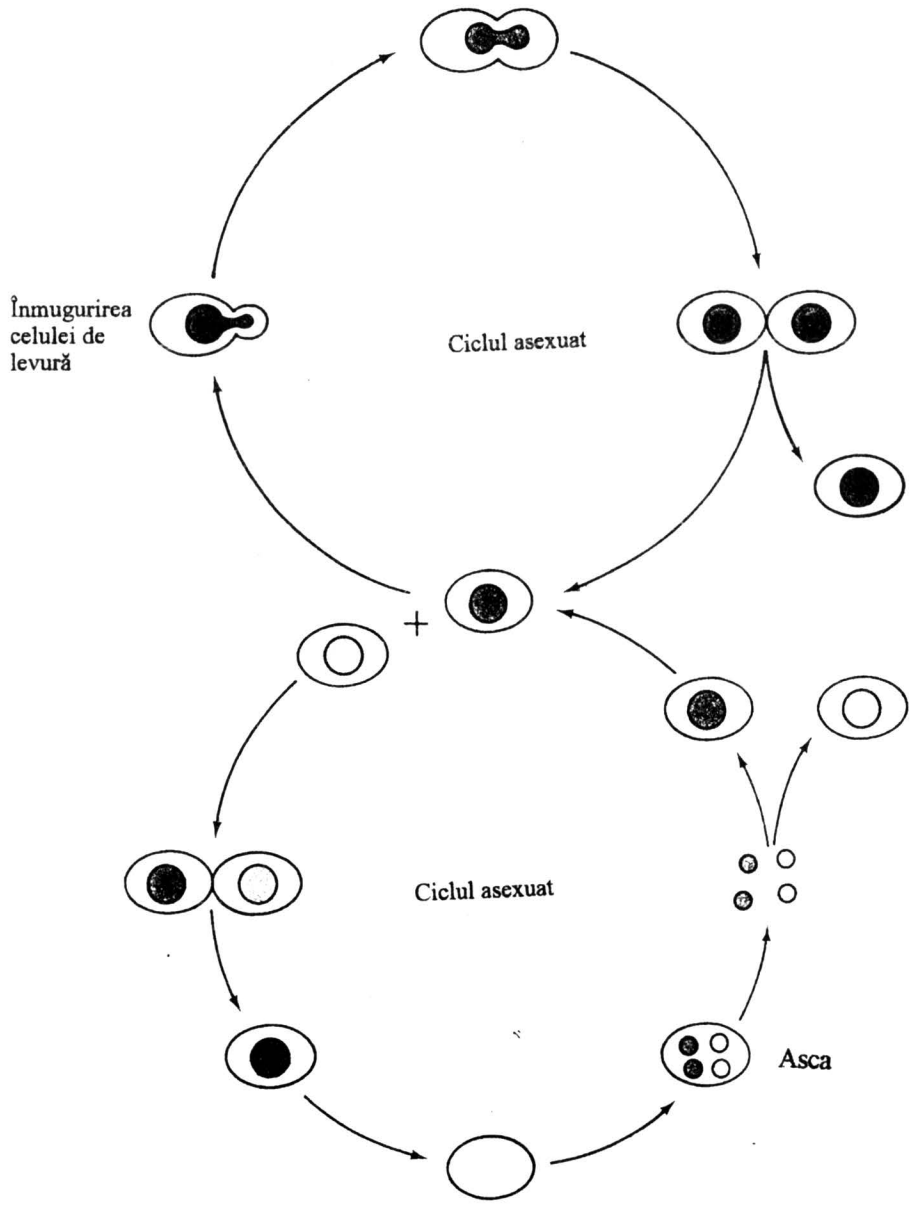


Fig. 248. Ciclul de viaţă la *Saccharomyces cerevisiae*. În ciclul asexuat, levura se multiplică prin înmugurire. În ciclul sexuat, două celule de polaritate sexuală opusă, fuzionează şi formează o ască. În interiorul ascei, după o diviziune meiotică se formează 4 ascospori haploizi, câte doi din fiecare tip sexual.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reproducerea asexuată prin *conidii* este comună. Ele se pot forma libere pe miceliu sau sunt organizate în corpi de fructificaţie, asemănători ascocarpilor. Adeseori, stadiul conidial şi cel de ască, apar pe micelii separate. Miceliul formator de conidii se mai numeşte stadiul *imperfect*, datorită absenţei modalităţii de reproducere sexuată, iar miceliul formator de asce se numeşte stadiul *perfect*, pentru că este sediul proceselor sexuale.

Basidiomycetes

Bazidiomicetele sunt fungii cei mai evoluaţi. Miceliul este pluricelular şi se distinge prin organul sporifer denumit *bazidie*, în care se formează bazidiosporii.

Grupul bazidiomicetelor include 20-30 000 de specii, cu morfologie diferită a talului, în funcţie de modul de viaţă: saprobionte sau parazite. Din acest grup fac parte fungii gelatinoşi, fungii care produc boli la plante (rugini, tăciuni, măluri), fungii consolă, care se dezvoltă pe scoarţa copacilor, fungii macroscopici (comestibili şi necomestibili).

Denumirile comune se referă la partea vizibilă a ciupercii, denumită *bazidiocarp*, susţinut de un miceliu asimilator bine dezvoltat, care penetrează substratul (solul sau materialele vegetale), pe care ciuperca fructifică.

Reproducerea sexuată. Structura purtătoare de spori sexuaţi a bazidiomicetelor este o celulă specializată, cu aspect măciucat, care se numeşte *bazidie*. La vârful ei se dezvoltă 4 bazidiospori, care proemină la exteriorul bazidiei. Sporii sunt eliberaţi şi după germinare se dezvoltă un miceliu. De cele mai multe ori, bazidiile se formează pe corpuri de fructificare (bazidiocarp).

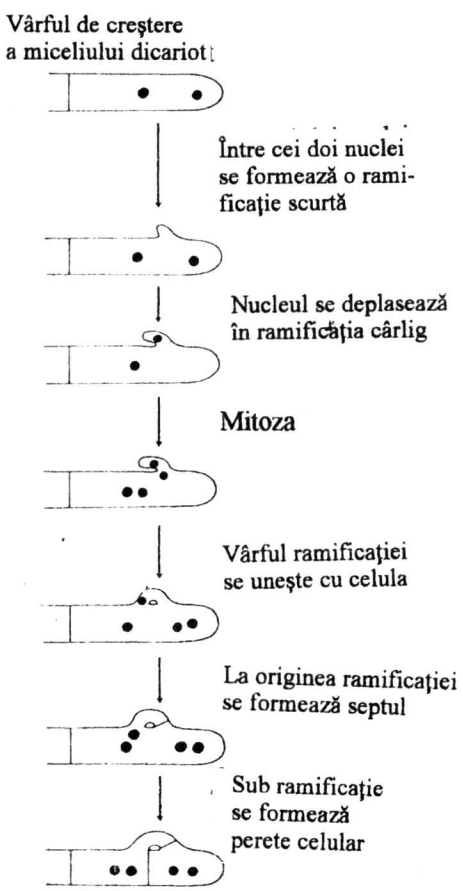


Fig. 249. Modalitatea diviziunii celulare într-o hifă dicariotică de bazidiomicete. În acest fel, fiecare din cei doi nuclei distincţi se distribuie în cele două celule. Structura caracteristică are forma de cârlig.

Cele mai multe bazidiomicete produc bazidii, organe de reproducere omologe ascei şi probabil derivate din ea. Bazidia se formează într-o structură hifală binucleată, sediul evenimentelor definitorii ale reproducerii sexuate: cariogamia şi meioza. Spre deosebire de ască, bazidia poartă bazidiosporii la exteriorul ei.

Bazidiosporul conţine un nucleu haploid. După germinare, din bazidiospor se dezvoltă un miceliu haploid monocariotic, septat, format din celule uninucleate. Faza miceliului uninucleat haploid este scurtă, deoarece curând se produce plasmogamia, care semnifică fuziunea a două hife monocariote. La bazidiomicete, organele sexuale lipsesc.

Celula dicariotică, formată prin plasmogamie, continuă să se dividă, dar îşi păstrează starea binucleată. Se formează un miceliu asimilator care penetrează în substrat.

Când condiţiile de mediu sunt favorabile procesului de reproducere, miceliul dicariotic suferă o morfogeneză complexă, pentru a forma un bazidiocarp. Unele din celulele bazidiocarpului se transformă în bazidii. Celulele din care se formează bazidiile (probazidii) sunt dicariote, având doi nuclei haploizi. Cei doi nuclei ai probazidiei fuzionează şi formează un nucleu diploid, care se divide meiotic. De obicei, bazidia dilatată formează la extremitatea ei liberă, 4 proiecţii alungite denumite *sterigme*. Vârful fiecărei sterigme se dilată pentru a forma bazidiosporul. In sterigmă, migrează un singur nucleu haploid şi întreaga structură devine bazidiospor. Bazidiosporii, de obicei, conţin un singur nucleu.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

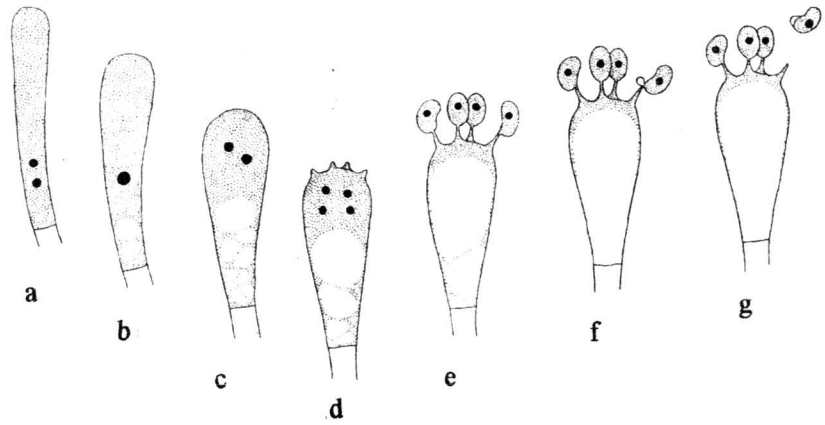


Fig. 250. Stadiile succesive ale formării bazidiei şi eliberării bazidiosporilor. a. O celulă binucleată. b. Fuziunea nucleilor. c, d. Diviziunea nucleară. e. Formarea bazidiosporilor. f, g. Eliberarea bazidiosporilor.

Rareori, în bazidiospori sunt încorporaţi doi nuclei şi se formează o bazidie care conţine numai doi bazidiospori binucleaţi.

Corpii de fructificare (bazidiocarpi) sunt caracteristici tuturor fungilor macroscopici, dar lipsesc la cei microscopici (tăciuni, măluri, rugini).

Bazidiosporii formaţi pe corpul de fructificare, se dispersează şi iniţiază creşterea miceliului. Miceliul haploid poate să crească extensiv, dar uneori, prin fuziunea a două micelii haploide, se formează miceliul dicariotic, care formează corpul de fructificaţie.

În anumite condiţii de mediu, hifele dicariote cresc şi formează structuri butonate submerse. Acestea sunt primordiile corpilor de fructificare. Butonii pot să rămână perioade lungi de timp, în stare latentă. În condiţii de umiditate optimă, butonii cresc rapid în câteva ore sau 1-2 zile, pe seama acumulării apei şi se formează corpi de fructificare. De multe ori, pe o suprafaţă de sol bine delimitată, se produce o adevărată "explozie" a formării corpilor de fructificare.

Reproducerea asexuată este comună la bazidiomicete, deşi este mai puţin frecventă decât la fungii inferiori şi ascomicete. Structurile reproducătoare asexuate la bazidiomicete sunt mugurii (ca şi la levuri), conidiile, clamidosporii şi oidiile. Oidiile se formează prin fragmentarea miceliului monocariotic: o hifă se fragmentează în celulele sale componente. Oidiile sunt haploide şi prin germinare se formează un miceliu haploid. Miceliile derivate din oidii, fuzionează şi formează un miceliu dicariotic.

Deuteromycetes (Fungi Imperfecti)

Grupul include circa 15 000 de specii de fungi, cărora, aparent le lipseşte stadiul sexuat de reproducere şi din această cauză se numesc *fungi imperfecti.* Se presupune că majoritatea organismelor cuprinse în acest grup sunt, stadiile asexuate ale fungilor care se reproduc sexuat, ce aparţin grupelor *Ascomycetes* şi *Bazidiomycetes.*

Ca grup, deuteromicetele sunt heterogene, speciile componente neavând origine comună şi nici raporturi filogenetice.

La unii reprezentanţi ai grupului s-a identificat existenţa unei faze sexuate a ciclului de viaţă. In astfel de situaţii, ambele stadii de dezvoltare a ciupercii (sexuat sau perfect şi asexuat sau imperfect) sunt transferate la grupul căruia îi aparţine stadiul perfect, în acord cu concepţia că, împreună, cele două stadii formează ciclul de viaţă complet al ciupercii.

Membrii grupului cresc pe orice tip de substrat. Unele sunt saprobionte pe materia organică vegetală în descompunere, iar altele sunt parazite la plante şi animale.

In acest grup sunt incluse "mucegaiurile", uşor cultivabile pe medii artificiale. Unele produc substanţe utile pe care se bazează industria micologică: antibiotice, acizi organici sau sunt folosite pentru obţinerea unor specialităţi de brânzeturi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Miceliul poate fi de tipul ascomicetelor, cu septuri intercelulare perforate, sau de tipul bazidiomicetelor, la care se formează septuri complexe şi conexiuni "cârlig".

Reproducerea se face prin fragmente miceliene sau prin spori. Unii membri ai grupului nu formează spori. Sporii pot fi oidii, clamidospori sau conidii. Conidiile se formează pe hife modificate şi specializate, denumite *conidiofori*, diferenţiate din miceliul vegetativ. Conidioforii pot fi neramificaţi sau ramificaţi, cu grosime uniformă sau dilataţi la vârf. Conidiile se pot forma la vârf (pentru cei neramificaţi) sau în diferite puncte pe traseul hifei specializate. Conidiile sunt colorate ca şi conidioforii. Ele sunt sferice, eliptice, curbate, răsucite, în formă de seceră. De cele mai multe ori, conidiile sunt unicelulare, dar uneori pot avea două sau mai multe celule.

Myxomycetes (Gymnomyxa)

Grupul cuprinde o varietate largă de organisme, care au fost clasificate ca fungi sau protozoare, caracterizate prin mai multe proprietăţi comune, dar care se deosebesc de fungii adevăraţi. Aparatul lor vegetativ este o masă amoeboidă, asemănătoare cu un protozoar, dar corpul de fructificare se aseamănă cu al fungilor şi aici se formează spori cu perete celular.

Aparatul vegetativ al mixomicetelor este o masă celulară nudă, denumită *plasmodiu*, mobilă pe suprafaţa unui substrat solid. Plasmodiul este alcătuit din celule amoebiene (denumite mixamoebe), lipsite de perete celular. Structurile reproducătoare formează corpi de fructificare, asemănători cu ai fungilor.

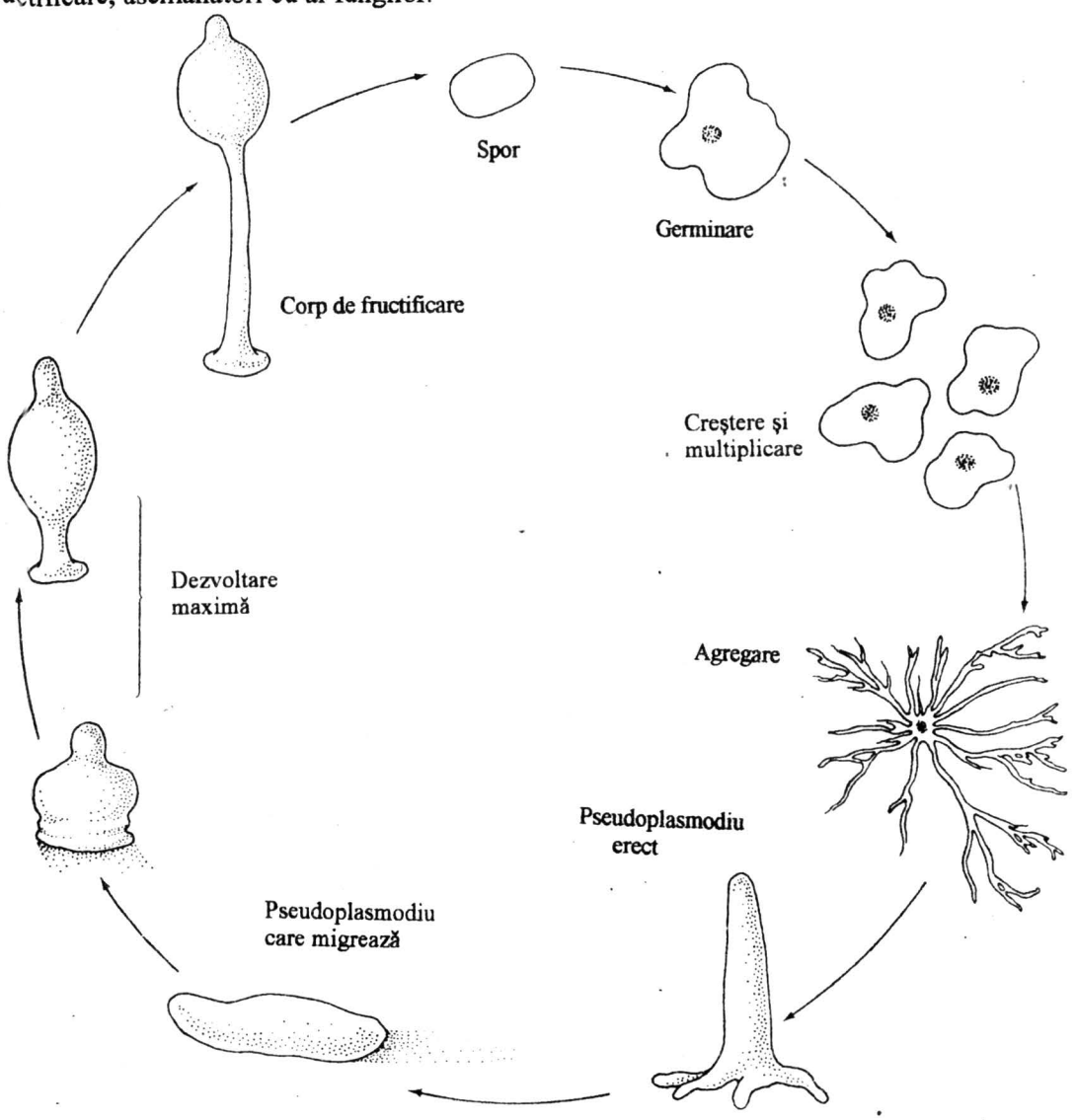


Fig. 25l. Ciclul de viaţă la *Dictiostelum discoideum*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Se cunosc circa 500 de specii de mixomicete. Sunt organisme heterotrofe şi se hrănesc cu materia vegetală în descompunere. Corpii de fructificare sunt viu colorați şi apar frecvent pe lemnul în descompunere din pădurile dense, cu grad mare de umiditate.

Unele sunt parazite. De exemplu, *Plasmodiophora brassicae* produce boli la conopidă, ridiche, nap, caracterizate prin deformarea rădăcinilor.

Mixomicetele sunt divizate în două grupe: *celulare* şi *plasmodiale*.

Cele cu organizare celulară au un aparat vegetativ alcătuit din celule individualizate, asemănătoare amoebelor. Aparatul vegetativ al mixomicetelor plasmodiale este format dintr-o masă de protoplasmă nediferențiată, de diferite aspecte şi dimensiuni, comparabil cu o amoebă gigantă plurinucleată. Se deplasează amoeboidal.

Mixomicetele se caracterizează printr-un ciclu de viață neobişnuit, cu alternanța unor structuri de aspect morfologic foarte variat. Cele de tip celular trăiesc şi se multiplică în sol, sub forma unor celule amoebiene, care se hrănesc cu bacterii pe care le fagocitează. După epuizarea sursei de hrană, celulele se agregă (dar nu fuzionează) în structuri multicelulare (pseudoplasmodii).

Cel mai cunoscut reprezentant este *Dictyostelium discoideum*. Agregarea celulelor este produsă de *acrasină*, o substanță identificată ca AMPc, cu efect chimiotactic pentru mixomicete. Pseudoplasmodiul manifestă fototactism şi se deplasează spre sursa de lumină. După încetarea deplasării, pseudoplasmodiul formează corpul de fructificare.

Agregatul multicelular (pseudoplasmodiul), prin procese morfogenetice complexe formează un corp de fructificare colorat. Acesta este un *sporocarp*, format dintr-un disc bazal, un peduncul şi o capsulă plină cu *spori*, la extremitatea pedunculului. Sporii sunt celule reproducătoare asexuate. In condiții de umiditate, sporii germinează şi rezultă celule individualizate denumite mixamoebe, care în privința modului de hrănire şi locomoție sunt asemănătoare cu amoebele. Se divid prin fisiune simplă. In condiții nefavorabile de mediu, ele se agregă în pseudoplasmodiu şi ciclul se reia.

Importanța fungilor

Fungii au un rol deosebit de important în natură, deoarece, fiind descompunători ai materiei organice, redau elementele biogene, circuitului natural. Fungii descompun toate categoriile de macromolecule caracteristice lumii vii: polizaharide, acizi organici, lignine, hidrocarburi aromatice şi alifatice, zaharuri, alcooli, aminoacizi, purine, lipide, proteine, acizi nucleici. O specie fungică oarecare poate să descompună numai anumite componente ale țesuturilor vegetale şi animale. Descompunerea substratului necesită acțiunea cooperantă a mai multor specii de microorganisme. Acțiunea degradativă a fungilor produce mari pierderi ale fructelor şi altor produse vegetale în depozite.

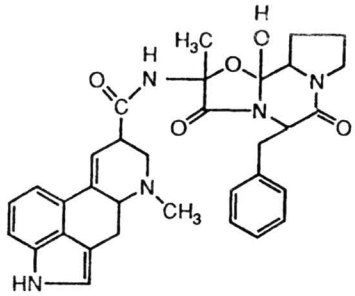
Unii reprezentanți ai fungilor au o importanță economică de prim ordin în bioindustria micologică (producerea antibioticelor, a acizilor organici etc.), iar fungii paraziți prezintă atât interes medical, dar în special pentru producția agricolă.

Ascomicetele au o importanță economică deosebită, atât prin potențialul lor distructiv, cât şi prin efectele benefice. Levurile sunt utilizate în producerea industrială a băuturilor alcoolice de fermentație şi în industria panificației, iar *Claviceps purpurea* (cornul secarei) este folosită ca sursă de medicamente (ergotina).

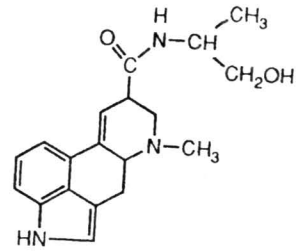
Morchella (zbârciogul) şi *Tuber* (trufe) sunt ascomicete comestibile. *Tuber* este o ciupercă sferică subterană, care creşte în jurul anumitor specii de stejar. Savoarea unică a acestor două specii, le face sa fie foarte căutate de gastronomi, deşi valoarea lor nutritivă este scăzută.

Claviceps purpurea este parazită şi creşte, în special, pe plantele de secară, dar şi pe alte plante cerealiere. Din ergotină (un alcaloid toxic), se extrag medicamente utilizate în tratamentul afecțiunilor vasculare, precum şi cunoscutul halucinogen LSD (acidul lisergic dietil-amida).

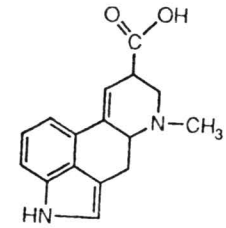
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Ergotamina



Ergonovina



Acidul lisergic

Fig. 252. Structurile moleculare ale alcaloizilor cu importanţă medicală, ergotamina şi ergonovina. Acidul lisergic produs de microorganisme este modificat chimic pentru prepararea la scară comercială, a ergonovinei.

Dintre macromicete, *Agaricus bisporus* este cultivată în amenajări speciale.

Dintre deuteromicete, cei mai importanţi sunt membrii g. *Penicillium*. Unele specii de *Penicillium* sunt producătoare de *penicilină*. *P. roqueforti* şi *P. camemberti* conferă savoarea distinctă şi consistenţa moale a brânzeturilor de Roquefort şi Camembert, datorită activităţilor enzimatice ale fungilor specifici. Miceliul se dezvoltă preponderent la suprafaţă, dar pătrunde şi în substrat şi prin acţiunea sa enzimatică îi diminuă consistenţa şi îi conferă o savoare unică.

Fungi patogeni

Circa 50 de specii de fungi sunt patogene pentru om şi animale. Majoritatea fungilor patogeni sunt agenţi infecţiosi oportunişti, care invadează ţesuturile organismelor cu rezistenţă scăzută la infecţie.

Infecţia fungică a ţesuturilor umane şi animale se produce pe fondul unor condiţii locale favorizante. Din această cauză, transmiterea infecţiei de la un organism la altul este rară. In general, maladiile fungice nu sunt contagioase.

Infecţiile produse de deuteromicete se numesc *micoze* şi pot fi împărţite în două categorii mari:

- infecţii *sistemice* sau profunde, în care agentul patogen este larg diseminat în organism şi creşte în diferite organe şi ţesuturi;
- micoze *superficiale*, care includ infecţii ale pielii, părului, unghiilor. Unii fungi produc numai un tip de infecţie, iar altele pe amândouă.

Pentru majoritatea fungilor patogeni nu se cunosc stadii de înmulţire sexuată şi de aceea poziţia lor sistematică este incertă. Unele micoze sistemice sunt produse de levuri. Altele sunt cauzate de fungi dimorfici, care cresc ca levuri *in vivo* (la 37°) şi ca miceliu la temperatură mai mică, *in vitro* pe medii artificiale.

Fungii patogeni trăiesc în sol şi pătrund în organism pe cale respiratorie, fiind inhalaţi odată cu aerul. De la poarta de intrare, agentul infecţios se disemineză în organism şi se instituie o infecţie cronică, cu simptome foarte variate. Infecţiile fatale sunt rare.

Infecţiile fungice apar frecvent, ca o consecinţă a eliminării microbiotei normale, prin terapie orală cu antibiotice. Câţiva fungi (*Cryptococcus neoformans, Coccidioides imitis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitides*) produc infecţii pulmonare foarte asemănătoare, prin manifestările clinice, cu tuberculoza.

Micozele superficiale sunt cauzate, în primul rând, de fungi micelieni (*Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton*). Ele au afinitate pentru ţesuturile care conţin keratina (piele, păr, unghii) şi produc enzima necesară degradării acestei proteine. Unele cresc pe suprafaţa firului de păr, iar altele la interior. Vârsta este un factor important care condiţionează sensibilitatea la infecţie: *impetigo* al pielii capului este frecventă la copii şi rară la adulţi, iar

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

infecţia interdigitală este frecventă la adulţi şi rară la copii. Acizii graşi nesaturaţi din secreţia glandelor sebacee ale adultului, au acţiune antifungică, ceea ce explică rezistenţa mai mare a adultului la infecţiile fungice superficiale. Una din substanţele antifungice, acidul undecilenic, se adaugă în compoziţia multor unguente, folosite în controlul infecţiilor fungice ale pielii.

Infecţia interdigitală ste favorizată de umiditatea locală crescută şi este produsă de fungi din g. *Epidermophyton.*

Fungii care produc infecţii superficiale se numesc *dermatofite.* Majoritatea infecţiilor cu fungii dermatofitici se pot trata eficient cu *griseofulvina,* un antibiotic antifungic produs de *Penicillium griseofulvum.* Griseofulvina se concentrează în celulele epidermice, la valori inhibitoare pentru creşterea dermatofitului.

Micozele *intermediare* sunt considerate acelea care produc leziuni epidermice, subcutanate, ale mucoaselor, plămânului. Infecţia se poate extinde şi în alte ţesuturi, la diferite profunzimi.

Infecţia este realizată de inhalarea sporilor, prin contaminarea rănilor sau prin ingestie. Cele mai tipice infecţii intermediare sunt *candidoza* şi *aspergiloza.*

Candidoza este produsă de variate specii de *Candida,* în special *C. albicans,* din grupul fungilor imperfecţi. In procesul infecţios se prezintă sub formă unei levuri, dar formează şi structuri miceliene. Infecţia se localizează, în primul rând, la nivelul membranelor mucoase, dar şi în piele sau plămân. Infecţiile mucoasei bucale a noului născut sunt comune, iar la adult produce infecţii bucale, tonsilare, vaginale.

Aspergiloza, cauzată de *Aspergillus fumigatus* este frecventă la puii de găină, în primele zile după ecloziune, la care produce infecţii de amploarea unei epidemii. Miceliul se dezvoltă abundent în plămân şi respiraţia devine imposibilă. Produce avortul la vacă, oaie etc. Omul prezintă rezistenţă naturală la infecţia cu *A. fumigatus.* Cazurile de îmbolnăvire sunt rare.

Fungi patogeni pentru plante. Cei mai importanţi agenţi patogeni ai plantelor, atât în ceea ce priveste numărul, cât şi a pierderilor economice produse, sunt fungii. Dintre fungii inferiori (*Plasmopara, Phytophtora, Peronospora* etc.) au un potenţial distructiv foarte mare, iar fungii care produc tăciunii, mălura, ruginile, aparţin bazidiomicetelor.

Fungii patogeni afectează toate tipurile de plante, de la cele ierboase, până la cei mai mari copaci. S-au studiat în special agenţii patogeni ai plantelor de cultură. Toate părţile aparatului vegetativ sunt sensibile la atacul fungilor. In general, o specie fungică are specificitate evidentă pentru anumite parţi ale plantei. Leziunile ţesuturilor gazdei se datorează producerii de toxine, blocării vaselor ce transportă apa şi nutrienţii sau inducerii malformaţiilor.

Micotoxine

Contaminarea produselor alimentare, a cerealelor si chiar a alimentelor preparate, cu fungi din sol este aproape inevitabilă. Depozitarea în condiţii improprii, favorabile creşterii fungilor, alterează caracteristicile de gust şi miros ale produsului. Cele mai multe mucegaiuri care cresc pe alimente sunt inofensive. Dar creşterea unor fungi pe substraturi alimentare este însoţită de sinteza şi eliminarea unor toxine puternice, denumite *micotoxine,* care produc îmbolnăvirea sau chiar moartea omului şi animalelor.

Cele mai cunoscute micotoxine sunt *aflatoxinele,* produse de *Aspergillus flavus,* toxice pentru om şi pentru multe specii de animale.

Din punct de vedere chimic, aflatoxinele sunt inele aromatice complexe. In doze mari sunt letale, iar în doze mici, induc tumori hepatice.

Alte micotoxine: ochratoxina (produsă de *A. ochraceus*), rubratoxina (*P. rubrum*), patulina (*A. clavatus*), stachibotriotoxina *(Stachybotrys atra).*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Factorul esenţial favorizant al creşterii fungilor în produsele alimentare, în cereale şi alimente este umiditatea. Producerea micotoxinelor are cea mai mare frecvenţă în depozitele de cereale, arahide şi nuci la umiditate mai mare de 15%. In regiunile tropicale, datorită umidităţii permanent crescute, dezvoltarea fungilor în produsele depozitate este greu de controlat. Este posibil ca apariţia endemică a neoplaziilor hepatice (în anumite zone din Africa) să se datoreze creşterii fungilor şi producerii de aflatoxine în produsele depozitate. Dată fiind importanţa lor pentru inducerea unor stări patologice, multe micotoxine au fost caracterizate chimic şi s-au elaborat metode pentru depistarea lor în produsele alimentare.

Intoxicaţia cu toxine fungice are o semnificaţie deosebită, în contextul comunităţilor care suferă de malnutriţie. In timpul tratamentului pentru malnutriţie, indivizii afectaţi suferă leziuni hepatice severe, datorate micotoxinelor. Intoxicaţia se produce din cauză că sursele proteice folosite pentru corectarea malnutriţiei (arahide, cereale) pot fi contaminate cu fungi producători de micotoxine.

Micotoxinele sunt un factor de mediu cu semnificaţie majoră, care influenţează starea de sănătate. OMS atrage atenţia asupra pericolelor pentru sănătate, pe care le atrage consumul alimentelor contaminate cu fungi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL IX

BIODIVERSITATEA MICROORGANISMELOR

Termenul de "biodiversitate" semnifică diversitatea tuturor organismelor vii, terestre şi acvatice şi include diversitatea în interiorul fiecărei specii, ceea ce echivalează cu *diversitatea genetică*, diversitatea speciilor unui ecosistem, ceea ce semnifică *diversitatea taxonomică* şi diversitatea ecosistemelor, care înseamnă *diversitatea ecologică* (di Castri, 1995). Cea mai scurtă definiţie a biodiversităţii este dată de formula: totalitatea genelor, speciilor şi ecosistemelor dintr-un areal. Biodiversitatea este într-o dinamică permanentă şi este definită ca un ansamblu de interacţiuni genetice în interiorul fiecărei specii, al speciilor şi al diversităţii ecologice.

Deşi biodiversitatea reprezintă o problemă actuală, nu numai pentru comunitatea ştiinţifică, ci şi pentru diferite organizaţii guvernamentale şi neguvernamentale, pentru politicieni şi economişti, interesul pentru diversitatea microorganismelor a fost, în mod neaşteptat, foarte scăzut.

Cele mai multe studii şi programe au ignorat total microorganismele sau le-au acordat o poziţie marginală.

Deşi au existat numeroase cercetări privind prezenţa, frecvenţa şi funcţiile microorganismelor în cele mai diferite medii naturale, prima încercare de interpretare a lor într-un cadru conceptual adecvat, a avut loc în anul 1990 (di Castri şi Younes).

Anul 1992 marchează prima recunoaştere oficială (Hawksworth şi Collwell), a necesităţii de a recupera ignoranţa asupra unor aspecte-cheie, privind diversitatea microorganismelor, care îndeplinesc, aşa cum este unanim recunoscut, activităţi indispensabile oricărei forme de viaţă.

Un imbold deosebit privind explorarea diversităţii microorganismelor în medii dintre cele mai neobişnuite a venit din partea biotehnologilor, impresionaţi de unele descoperiri recente din microbiologie şi oarecum dezamăgiţi de limitele şi diferenţele dintre speranţele şi realizările ingineriei genetice. Ei au ajuns la concluzia că "biodiversitatea naturală reprezintă cea mai mare resursă a Planetei, cel mai puţin utilizată pentru inovaţie în biotehnologie" (Bull, 1992).

Studiile de diversitate a microorganismelor sunt marcate de o serie de dificultăţi specifice: în primul rând, de nevoia de a le studia nu ca indivizi, ci ca populaţii şi nu în mediul lor natural, ci în condiţii artificiale de laborator. Dar, caracterele fenotipice care stau la baza sistematicii tradiţionale se pot modifica (evident, în limite fixate de genotip), în aşa fel încât microorganismele cultivate nu reproduc niciodată fenotipul natural, ci unul corespunzator condiţiilor artificiale în care sunt puse.

Dificultăţi majore sunt legate de studiul asocierilor diferite dintre microorganisme, precum dintre micro- şi macroorganisme, de la cele facultative la cele obligat simbiotice sau parazitare, ca şi din inconvenientele decurgând din explorarea mediilor greu accesibile sau extreme. În cazul bacteriilor, se adaugă marea variabilitate, determinată de transferul orizontal de gene purtate de plasmide, prin procese de parasexualitate, care nu sunt limitate numai în cadrul speciei, ci se pot produce interspecific, intergeneric şi probabil chiar între regnuri diferite (de exemplu, între bacterii şi fungi). Frecvenţa proceselor de transfer în mediile naturale (sol, acvifere, căile digestive etc.) este mult mai mare decât era de aşteptat pe baza experienţelor de laborator (Kellenberg, 1994). În sfârşit, o altă dificultate majoră, deosebit de pregnantă, mai

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ales în cazul bacteriilor, provine din lipsa unei concepţii clare privind definirea speciei, esenţială pentru studiile de diversitate şi, decurgând din aceasta, absenţa unui sistem natural de clasificare.

S-a recurs la soluţii controversate, considerate de unii autori ca inaplicabile izolatelor din mediile naturale, acceptabile din punct de vedere pragmatic, operaţional utile, de identificare pe criterii arbitrare, selecţionate subiectiv, în funcţie de asemănări, trecând cu vederea caracterele necomparabile sau divergente.

Datorită acestor sisteme de clasificare create artificial, condamnate să greşească, cunoştiinţele privind diversitatea microorganismelor sunt foarte sumare şi contradictorii, atât sub raportul numărului global de specii estimate, cât şi privitor la cele identificate (tabelul de mai jos).

Numărul speciilor virale şi biologice cunoscute şi al celor considerate ca existente în natură sunt prezentate în tabel. Denumirile diferitelor grupuri sunt utilizate sens colocvial şi nu taxonomic (după date din literatura de specialitate).*

Grupul	Numărul de specii cunoscute	Numărul total al Speciilor	% specii cunoscute
Virusuri**	5 000	130 000 – 500 000	4 – 1
Bacterii***	3 058 – 4760	40 000 – 8 000 000	7 – 0,05
Fungi****	69 000	1 500 000	5
Alge	4o 000	350 000 – 10 000 000	11 – 0,4
Protozoare	30 80	100 000	31
Briofite	17 000	25 000	68
Gimnosperme	750	?	?
Angiosperme	250 000	270 000	93
Porifere	5 000	?	?
Cnidarii	9 000	?	?
Nematode	15 000	500 000	3
Crustacee	38 000	?	?
Insecte	800 000	6 – 10 000 000	8 – 13
Alte artropode + nevertebrate inferioare	132 460	?	?
Moluşte	50 000	?	?
Echinoderme	6 100	?	?
Amfibieni	4184	?	?
Reptile	6380	?	?
Peşti	19 000	21 000	90
Păsări	9 198	>10 000	90
Mamifere	4170	>4 000	100

* După di Castri şi Younes (1990), Mc Neely şi colab. (1990), Bull şi Hardman (1991), Select Committee Science adn Technology (1991, 1992, Bulll, Goodfellow şi Slater (1992), Truper (1992), Groombridge (1992).

** Definiţia standard a speciei biologice nu se aplică virusurilor. Eigen (1993) propune conceptul nou de "quasispecie", aplicabil exclusiv acestor entităţi infecţioase.

*** Inclusiv *Cyanobacteria* şi *Archaebacteria*.

**** Inclusiv levurile şi fungii lichenizaţi.

Semnele de întrebare marchează absenţa estimărilor sau a unor date certe pentru grupurile respective de organisme.

Decurgând din aceasta, cunoştiinţele referitoare la multe din funcţiile lor ecologice specifice şi la proprietăţile lor potenţiale, sunt foarte limitate.

Diversitatea bacteriilor este puţin cunoscută. Numărul global al speciilor bacteriene este estimat în limite uimitor de largi: 800 000 (Klaus şi Kubitki, 1982), 30 000 (di Castri şi Younes, 1990), 2 – 3 milioane (Truper, 1992) şi 8 milioane (Groombridge, 1992).

Cifra maximă, considerată iniţial ca nerealistă este susţinută de numeroase observaţii recente, care sugerează că fiecare din cele 6 – 10 milioane de specii de insecte, poate purta cel puţin o specie bacteriană ignorată până în prezent.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Margulis, Chase şi Guerrero (1986) au demonstrat că fiecare specie de termite din genul *Triconympha* poartă în medie 1o specii de bacterii noi pentru ştiinţă. Eliminarea lor cu ajutorul antibioticelor determină moartea gazdelor axenice, după o săptămână, fapt ce demonstrează rolul lor esenţial în viaţa insectelor. În sprijinul acestui punct de vedere pledează observaţia lui Hawksworth (1992), după care, în asociere cu insectele ar exista cel puţin un milion de specii ignorate, aparţinând genului *Spiroplasma* (*Mollicutes*), probabil cel mai bogat în specii dintre genurile prezente în natură. Se adaugă numărul mare de specii bacteriene prezente în diferite tipuri de relaţii cu acarienii.

Prin contrast cu aceste date, numărul speciilor identificate este, în estimările cele mai optimiste, de ordinul a 3 ooo – 4 ooo, ceea ce reprezintă 0,04 – 0,05% raportat la estimările maxime. Datorită acestui fapt, sistematica bacteriană reprezintă singurul domeniu în care numărul speciilor identificate a scăzut de la 21 ooo, înregistrat în Index Bergeyana (1974) şi în suplimentele sale, la 2 258 specii (inclusiv cianobacteriile, aparţinând la 561 genuri, în determinatorul Bergey (1994). Explicaţia rezidă în faptul că datorită ineficienţei tehnicilor clasice, aceiaşi specie a fost descrisă de mai multe ori, sub diferite denumiri, infirmate ulterior cu metodele moderne. Cauzele acestei situaţii sunt multiple:

– numărul mic de specii descrise reflectă deficienţele metodelor tradiţionale de izolare şi identificare. Datorită diversităţii lor fiziologice, nici un mediu de cultură şi nici un set de condiţii de creştere nu corespund diferitelor categorii de microorganisme;

– insuficienţa explorare a unor medii naturale greu accesibile (largul şi sedimentele mărilor şi oceanelor, gradientele intermediare între condiţiile nete de aerobioză şi anaerobioză etc.) sau a celor heterogene (solul etc.).

– o altă motivaţie decurge şi din faptul că microbiologii şi-au focalizat aria de interes aproape exclusiv asupra unor bacterii importante pentru medicină, agricultură şi industrie. Majoritatea studiilor fundamentale s-au concentrat asupra unei singure bacterii – *E coli* – ajungând la ideea falsă că înţelegerea aprofundată a biologiei acesteia ar fi o paradigmă pentru cunoaşterea bacteriilor în general şi chiar, într-un sens mai larg, a tuturor organismelor;

– un factor important – puţin aşteptat – este acela că în multe medii naturale, microorganismele se găsesc într-o stare de stress, datorită unor condiţii nefavorabile (lipsa de nutrienţi în multe medii acvatice, variaţii de pH, temperatură etc.). Condiţiile de supraalimentare, tipice pentru mediile artificiale de cultură sunt inhibitoare, toxice sau chiar letale pentru microorganismele din mediile naturale. Între acestea se înscrie un spectru larg de bacterii "necultivabile", corespunzatoare diferitelor strategii de supravieţuire la stress, cum sunt, în principal, aşa zisele bacterii "nerecuperabile" sau *ultramicrobacterii* (Torella şi Morita, 1980).

Urmarea este că în funcţie de diferiţi factori, pot fi cultivate şi identificate foarte puţine dintre bacteriile vizibile prin microscopie directă, restul de 99,9% din speciile existente în natură, rămânând inaccesibile metodelor tradiţionale de izolare şi identificare.

Importanţa studiilor de biologie moleculară

Insatisfacţia produsă de deficienţele sistematicii clasice, la care s-au adăugat progresele biologiei moleculare şi nu în ultimul rând, tentaţia unei abordări filogenetice (de trecere de la simple exerciţii intelectuale speculative, la descifrarea unor aspecte ale evoluţiei microorganismelor, bazate pe date experimentale) au dus la utilizarea progresivă a tehnicilor moleculare. Ele includ o gamă relativ largă, cele mai frecvent folosite fiind: compoziţia în baze (G + C%), hibridarea ADN/ADN şi ADN/ARN, sondele de ADN şi de ARN, secvenţa bazelor ADN genomic şi ARNr (5S, 16S şi 23S) etc.

Aplicarea tehnicilor moleculare la un număr mare de habitate naturale a relevat existenţa unui rezervor enorm de bacterii necultivabile, până în prezent necunoscute, prin evidenţierea unui număr imens de genomuri bacteriene diferite. Astfel, într-o probă de sol, din care, cu metodele clasice se izolează un număr limitat de specii, tehnicile moleculare evidenţiază

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

între 5 000 şi 13 000 de genomuri diferite. Această situaţie s-ar datora şi marii heterogenităţi a solului, fiecare probă incluzând multe microhabitate diferite, cu microbiotele corespunzătoare. Mediile acvatice sunt mult mai omogene şi, ca urmare, conţin un număr mai mic de genomuri bacteriene, bogăţia în specii fiind cu mult mai mică decât în sol. Datele menţionate demonstrează că indicii de diversitate calculaţi pe baza studiilor tradiţionale se referă numai la o mică parte din comunităţile reale de microorganisme, şi anume, la cea care poate fi cultivată, iar organismele descrise ca dominante pot fi, în realitate, dintre cele mai puţin reprezentative pentru comunitatea naturală. Această diversitate reală nu trebuie ignorată, deoarece formele necultivabile sunt viabile, înglobează nutrienţi, fac sinteze proteice (Chowdburry, 1993), iar în unele medii pot metaboliza cantităţi semnificative de nutrienţi, având un rol important în reţelele trofice ale ecosistemelor respective.

Chiar mai mult, bacteriile aflate în stare de latentă sau " repaus" (care nu se multiplică) pot transfera gene şi sunt uneori hipermutabile. Datorită prezenţei unor enzime şi funcţii metabolice complet diferite faţă de normal, ele pot "adapta" mutaţiile ("mutaţii dirijate" sau "induse de selecţie") la nevoile celulei, de a relua sau de a continua creşterea (Kellenberger, 1994).

Tehnicile de biologie şi genetică moleculară au schimbat radical înţelegerea diversităţii microorganismelor, evidenţiind gradul imens de heterogenitate genetică a taxonilor microbieni şi permiţând detectarea unor grupuri de microorganisme, până în prezent necunoscute. În acest sens există numeroase probe concrete. Astfel, pe baza criteriilor moleculare s-a demonstrat că cele 19 tulpini de *Deinococcus radiopugnans*, considerate ca absolut identice pe baza tehnicilor clasice convenţionale, aparţineau la 17 tipuri atât de diferite încât apartenenţa lor la o singură specie era exclusă.

Un alt exemplu semnificativ este furnizat de datele lui Ward, Weller şi Bateson (1990), care au analizat structura ARNr extras dintr-o împâslire de cianobacterii dezvoltate pe suprafaţa apei provenite din izvorul Octopus din Yellowstone National Park (SUA). Studiile amănunţite cu tehnici clasice efectuate de-a lungul mai multor ani au permis stabilirea prezenţei "cu certitudine" a 14 specii diferite. Analiza ARNr 16S a permis identificarea a încă opt specii noi, demonstrând valoarea limitată a metodelor tradiţionale, care ignoră o parte semnificativă din diversitatea reală a comunităţilor de microorganisme.

În sfârşit, sistematica moleculară a demonstrat că una din cele mai active şi mai studiate bacterii celulozolitice din rumen, descrisă de taxonomia clasică sub denumirea de *Bacteroides succinogenes* este, în realitate, o asociere a două specii, genetic distincte: *Fibrobacter succinogenes* şi *F. intestinalis* (Montgomery şi colab. 1988). Aceste rezultate cu consecinţe pozitive majore au creat şi un anumit impas, deoarece demonstrează că în foarte multe cazuri, caracterele clasice fenotipice sunt înşelătoare şi, în plus, lipsite de orice relevanţă filogenetică.

Opinia curentă este că datorită lor, taxonomia bacteriană actuală va fi complet rescrisă pe baze experimentale şi că definirea taxonilor săi se va deplasa progresiv, de la nivelul organismic/celular, la cel molecular. Ţinând seama însă de complexitatea sistemelor biologice, chiar la nivelul cel mai simplu, reprezentat de bacterii, un demers de acest gen este evident reducţionist şi nescutit de riscuri.

Opţiunea ideală este cea a unei taxonomii polifazice, integratoare, bazată pe utilizarea informaţiilor fenotipice, chemotaxonomice şi genetice, precum şi pe cele ecologice.

Diversitatea microalgelor. Majoritatea autorilor apreciază numărul speciilor cunoscute la circa 40 000, iar al celor existente, la 4oo ooo. Prin contrast Andersen (1992) estimează numărul global al speciilor algale la peste lo milioane, datorită, în special, marii diversităţi a clasei *Bacillariophyceae*.

Deşi sunt ubicvitare (apele dulci şi marine, în sol, pe roci şi pe plante, pe gheţari şi zăpezi veşnice) şi au o mare diversitate, microalgele sunt un grup relativ puţin explorat. Andersen (1993) explică această situaţie printr-o serie de factori, proprii anumitor medii: l) dimensiunile mici, decurgând din situaţia paradoxală în care cel mai mare ecosistem, reprezentat de biotopurile acvatice, care acoperă 75% din suprafaţa biosferei şi 90% din volumul ei (Shilo, 1980) este dominat de cele mai mici organisme; 2) accesul dificil la multe medii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

naturale; 3) mobilitatea unor specii algale şi capacitatea de a-şi schimba frecvent poziţia; 4) modificările dramatice ale numărului şi speciilor prezente în unele medii, în perioade scurte de timp; 5) variaţiile de temperatură şi de iradiere solară; 6) heterogenitatea mediului natural, variabil şi dinamic şi interacţiunile complexe; 7) absenţa unui concept clar şi universal acceptat cu privire la definirea speciei.

Diversitatea fungilor. Numărul speciilor cunoscute în anul 1983 era de 69 000, iar cel real este estimat la 1 000 000 – 1 500 000 (Hawksworth, 1988; May, 1991).

Grupul de fungi cu cel mai mic număr de specii este reprezentat de levuri, cu aproximativ 590 de specii, aparţinând la 81 de genuri, dintre care au fost identificate peste 500 specii (Barnett şi colab., 1990). Această situaţie este determinată de mai mulţi factori: 1) sunt puţine numeric; 2) se dezvoltă uşor pe medii artificiale de laborator; 3) sunt uşor observabile prin microscopie fotonică; 4) atât speciile patogene cât şi cele de interes tehnologic au fost mult studiate datorită interesului pentru practică. În plus, în prezent sunt considerate ca arhetip al celulelor eucariote şi, în consecinţă, folosite ca model de selecţie pentru studiile fundamentale ca şi pentru producerea de proteine recombinante prin tehnici de inginerie genetică.

Diversitatea protozoarelor este puţin studiată, deşi, ca şi în cazul algelor, multe specii pot fi identificate pe criterii morfologfice. După unii autori, ar fi grupul cel mai numeros de organisme prezente în natură. Numărul global al speciilor este estimat la peste 100 000, iar al celor cunoscute, la 30 800 (31%).

Diversitatea virusurilor este puţin studiată. Nefiind sisteme biologice, aceste entităţi infecţioase nu se încadrează în conceptul de specie biologică – standard. Eigen (1993) propune un concept nou, de "quasispecie". Numărul "speciilor" virale identificate este de 5 000, iar al celor estimate ca prezente în natură, de circa 500 000.

Ansamblul acestor date sugerează în cazul microorganismelor, un grad foarte mare de diversitate, comparativ cu macroorganismele (cu excepţia insectelor). Prin contrast, numărul speciilor identificate este foarte mic şi perspectivele îmbunătăţirii acestei situaţii nu sunt apropiate: în plan global, anual sunt descrise circa 1o ooo de specii noi, dintre care numai 120 sunt bacterii şi 1 700 sunt fungi (Preston Cloud, 1988).

Particularităţile diversităţii microorganismelor în diferite ecosisteme

Ca regulă generală, microorganismele sunt bine dotate pentru a avea o distribuţie foarte largă şi o tendinţă generală de raspândire ubicvitară, determinată de dimensiunile mici, uşurinţa dispersării prin apă şi aer, adaptabilitatea enormă, datorită versatilităţii şi flexibilităţii metabolice, multiplicării rapide şi capacităţii de a tolera condiţii nefavorabile pentru alte organisme, prin prezenţa unor forme specifice de rezistenţă sau de adaptare la medii extreme.

După Groombridge (1992), varietatea nişelor ecologice exploatate de principalele grupuri de macro- şi microorganisme este direct corelată cu vârsta lor geologică ("ecologia recapitulează filogenia", Price, 1988). Ca urmare, cel mai mare spectru de nişe aparţine bacteriilor, urmate în ordine descrescândă de alge, protozoare, fungi, animale şi plante.

Condiţiile de mediu influenţează compoziţia în specii a comunităţilor bacteriene şi, în anumite condiţii pot fi esenţiale pentru supravieţuirea speciilor individuale. În consecinţă, particularităţile de diversitate ale unui mediu natural sunt influenţate de gradiente fizico-chimice (nutrienţi organici şi anorganici, pH, substanţe toxice, temperatură etc.) şi variază în diferite grade, de la diversitatea mare din sol, la cea redusă din apele curgătoare nepoluate şi, mai ales, în unele medii extreme.

Diversitatea speciilor microbiene tinde să fie mică şi limitată la populaţii foarte specializate, în ecosistemele controlate fizic (izvoare calde şi fierbinţi, mlaştini acide, regiuni de deşert etc.), în care influenţa stressului fizico-chimic puternic, prevalează faţă de interacţiunile echilibrate şi integratoare dintre specii.

Prin contrast, diversitatea speciilor tinde să fie mai mare în ecosistemele controlate biologic, în care importanţa interacţiunilor dintre populaţiile de microorganisme depăşeşte influenţa mediului fizico-chimic (abiotic). Acesta este cazul solului nepoluat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Regiunile şi habitatele cu mare diversitate de macroorganisme sunt, deopotrivă, bogate în microorganisme ca o consecinţă a numărului mare de microorganisme saprobionte, simbiotice sau parazitare (Whitecomb şi Hackett, 1988). Există însă şi habitate fără nici o importanţă pentru macroorganisme, dar în care prezenţa şi conservarea diversităţii microorganismelor este esenţială.

Comunităţile de microorganisme cu o mare diversitate sunt mai stabile şi mai apte să competiţioneze în limite largi de toleranţă faţă de fluctuaţiile mediului, deşi nu se cunoaşte nivelul prag de diversitate necesar pentru a menţine stabilitatea comunităţii (Atlas, 1992). Capacitatea de a competiţiona poate fi depăşită de perturbările severe şi/sau continue ale mediului. Spre exemplu, comunitatea stabilă, diversă a nămolului activat din staţiile de epurare a apelor uzate poate tolera influxul accidental sau continuu al unor concentraţii mici de substanţe chimice toxice, în timp ce aportul masiv al acestora o dezechilibrează până la suprimare.

O categorie aparte o reprezintă microorganismele *extremofile* care populează mediile cele mai neobişnuite ca: în mediile hipersaline şi chiar cristalele de sare, îngheţurile polare şi zăpezile veşnice, apele termale şi fierbinţi, mediile hiperalcaline şi hiperacide etc.

La limita extremă se situează populaţiile de bacterii hipertermofile (*Pyrococcus furiosus*) sau "superhipertermofile" (*Pyrolobus fumarii*), care se dezvoltă încă la 113° C, în pereţii "fumegătorilor" din izbucurile hidrotermale suboceanice (Galapagos Rift). Dezvoltarea este optimă la 105° C şi încetează la 90° C. Aceste date sugerează ca limită de temperatură maximă de creştere pentru procariote (mult mai rezistente decât eucariotele), temperatura de 150°, la care se desfac legăturile chimice din moleculele informaţionale şi din alte macromolecule esenţiale.

Semnificaţia marii diversităţi microbiene într-un habitat

Prezenţa unui anumit grad de diversitate este o necesitate absolută pentru a asigura funcţiile variate, necesare funcţionării reţelelor trofice, a ciclurilor biologice şi pentru menţinerea ecosistemului (Solbrig, 1990). Situaţia este foarte evidentă în cazul habitatelor ce conţin substanţe "recalcitrante", a căror degradare nu este posibilă decât prin procese de co-metabolism.

Deşi există unanimitate în a considera că microorganismele reprezintă un component esenţial, fără de care nu poate exista un ecositem stabil, semnificaţia marii diversităţi microbiene nu are o explicaţie unanim admisă.

Bazaţi pe caracterul ubicvitar al microorganismelor şi pe marea lor versatilitate metabolică, unii cercetători consideră că bogaţia în specii microbiene a unui ecosistem nu ar corespunde unei nevoi reale pentru menţinerea ecosistemului. Ea ar fi, mai degrabă o expresie a acestui caracter ubicvitar.

În opoziţie cu acest punct de vedere, se consideră pe baza a numeroase observaţii, că un anumit grad de redundanţă funcţională, asigurat de prezenţa în unele regiuni, a unui mai larg spectru de specii diferite, capabile să îndeplinească funcţii similare este, fără îndoială, benefică pentru menţinerea şi stabilitatea ecosistemului.

Un exemplu ilustrativ este cel al ectomicorizelor din pădurile temperate, în care unele specii de arbori pot forma micorize cu peste loo de specii diferite de fungi. Fenomenul este foarte important, datorită sensibilităţii fungilor de micorize la poluare. În aceste condiţii, practic totdeauna se vor selecţiona unele specii de fungi, rezistenţi faţă de poluanţi, care vor asigura producerea ectomicorizelor. Habitatele respective sunt avantajate: în mediile cu grad ridicat de biodiversitate, dispariţia unei specii, chiar dacă este dominantă, poate fi înlocuită de o specie "mascată" ("ascunsă") funcţional, capabilă să o înlocuiască. De aceea, redundanţa funcţională

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

conferă stabilitate, rezistența la stress și o capacitate superioară de recuperare, întrucât pierderea unei specii-cheie este "tamponată" de altele cu funcții similare (Pery și colab., 1989, Bull și colab., 1992).

Dispariția unor specii de microorganisme este o realitate, demonstrată atât pe baza unor observații certe, cât și prin analogie cu acest fenomen, în cazul plantelor și animalelor.

Datele existente sunt sumare. Știm foarte puțin referitor la mecanismele care determină o diminuare a diversității microorganismelor și, în special, asupra speciilor esențiale pentru anumite ecosisteme, respectiv asupra celor a căror eliminare ar putea avea efecte nocive asupra stabilității sau chiar a existenței unui ecosistem.

Cuantificările acestor pierderi sunt iluzorii deoarece, după cum am arătat, cunoștințele asupra diversității microorganismelor sunt foarte reduse. Unele date sunt bazate pe simple presupuneri, sau pe extrapolarea datelor din regiuni de megadiversitate. Astfel, Raven (1988), pe baza datelor privitoare la reducerea suprafeței pădurilor tropicale, apreciază că până în a doua decadă a secolului următor, vor dispărea aproximativ 35 ooo de specii de fungi.

Este normal de conceput că microorganismele asociate cu plantele și animalele pot fi conservate atâta timp cât sunt protejate gazdele lor și că dispariția sau degradarea acestora au consecințe asupra diversității microorganismelor.

Cuantificările dispariției unor microorganisme din apele dulci, marine sau chiar din sol sunt mai greu de formulat. Oricum, dispariția unor specii este la fel de inacceptabilă și de alarmantă, nu numai pentru botaniști și zoologi, ci și pentru microbiologi.

Sfarșitul secolului găsește științele microbiologice într-o situație paradoxală: triumfătoare, datorită uimitoarelor progrese în domeniul propriu și rolului lor esențial în revoluția biologiei moleculare și a celei biotehnologice și, profund ignorante în ceea ce privește cunoașterea propriului obiect de studiu.

Studiul diversității microorganismelor furnizează o direcție cu importanță majoră de lucru – din păcate neluată în seamă de cercetarea microbiologică – și o șansă pentru a face să se atenueze acest imens decalaj.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

NOŢIUNI DE ECOLOGIE A MICROORGANISMELOR

A. INTERACŢIUNILE DINTRE POPULAŢIILE DE MICROORGANISME

Majoritatea habitatelor naturale sunt populate de asociaţii polispecifice de microorganisme. Numărul speciilor depinde de complexitatea şi diversitatea chimică a substanţelor nutritive.

Starr şi Chatergee (1972) clasifică interacţiunile dintre microorganisme pe baza a trei criterii fundamentale:

1) după localizare şi modul de existenţă în raport cu altele: comensalism, simbioza, parazitism, prădare;

2) în funcţie de rezultatul asocierii: neutralism, mutualism, antagonism;

3) în funcţie de gradul de dependenţă a asociaţei: accidental, facultativ, obligatoriu.

Unele interacţiuni sunt pozitive (benefice): comensalismul, protocooperarea şi mutualismul. Altele sunt negative (competiţia, amensalismul). Unele sunt benefice pentru un partener şi dăunătoare pentru celălalt (parazitismul, prădarea), iar altele sunt de indiferenţă (neutralismul).

Interacţiunile posibile între populaţiile a două specii de microorganisme (adaptat după Odum, 1971).

Tipul de interacţiune	Specia		Natura generală a interacţiunii
	A	B	
Neutralism	0	0	Nici una din populaţiile asociaţiei nu este afectată.
Comensalism	+	0	Populaţia (A) comensală beneficiază, cea asociată (B) este neafectată.
Protocooperare	+	+	Interacţiune neobligatorie, bilateral benefică.
Mutualism	+	+	Interacţiune obligatorie, bilateral benefică.
Competiţie prin interferenţă directă	–	–	Fiecare din cele două specii o poate inhiba direct pe cealaltă.
Competiţie prin utilizarea nutrienţilor	–	–	Fiecare din cele două specii o poate afecta pe cealaltă, prin consumarea unui nutrient puţin abundent.
Amensalism	0	0	Una din populaţii (A) este inhibată, cealaltă (B) este neafectată.
Parazitism	+	–	Populaţia A, cu dimensiuni mai mici parazitează populaţia B.
Prădare	+	–	Populaţia prădatoare A atacă populaţia gazdă B.

Neutralismul

Asocierea de tip neutral este lipsită de influenţe reciproce, dar este considerată puţin probabilă în mediile naturale. Neutralismul este favorizat de mediile cu condiţii restrictive care permit creşterea microorganismelor cu o rată minimă sau pentru cele foarte diferite sub raportul exigentelor nutritive, adică nu intră în competiţie pentru acei nutrienţi.

Interacţiuni pozitive

Interacţiunile pozitive sunt relaţii de tip cooperant care măresc rata de creştere a microorganismelor asociate. Efectul pozitiv se poate produce chiar între celulele aceleiaşi specii. De exemplu, formarea coloniilor asigură o utilizare mai eficientă a substanţelor nutritive.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Interacţiunile pozitive sunt foarte importante în mediile naturale, pentru degradarea compuşilor chimici foarte rezistenţi (lignina, hidrocarburi, diferite substanţe de sinteză) sau pentru producerea metaboliţilor disponibili pentru alte microorganisme.

Creşterea colonială este probabil o adaptare bazată pe interacţiuni cooperante în populaţie. De exemplu, producerea enzimelor degradative furnizează nutrienţi pentru toţi membrii coloniei, în timp ce creşterea diseminată a celulelor unei populaţii duce la inaccesibilitatea nutrienţilor prin diluţie. Chiar microorganismele mobile ramân asociate în colonii, dar coloniile mobile oferă avantajul de a se deplasa în zonele mediului cu concentraţii mari de nutrienţi.

Comensalismul

Comensalismul sau metabioza defineşte creşterea asociată a două specii de microorganisme, aflate într-o relaţie în care una profită de asociere, iar cealaltă nici nu profită, nici nu este influenţată negativ.

Se disting două categorii de microorganisme comensale:

a) *ectocomensale* - situate pe suprafaţa altor microorganisme, plante sau animale, de obicei prin intermediul unor structuri specializate de legare (fimbrii, structuri de tip crampon la *Caulobacter*);

b*) endocomensale* - prezente în tubul digestiv al animalelor.

Protocooperarea

Este o relaţie de mutualism neobligatoriu şi nespecific, în care cei doi parteneri beneficiază reciproc. De exemplu, relaţia cooperantă dintre cianobacterii şi bacteriile heterotrofe asociate tecii gelatinoase a acestora. Cianobacteriile eliberează substanţele organice, pe care bacteriile heterotrofe le utilizează ca substrat nutritiv. Aşa se explică persistenţa bacteriilor heterotrofe asociate cianobacteriilor şi dificultăţile de a obţine culturi axenice de cianobacterii.

Azotobacter fixează N_2, utilizând substanţe organice simple pe care le furnizează alte microorganisme care hidrolizează moleculele complexe.

Sinergismul

Este o formă de protocooperare între două sau mai multe tipuri de microorganisme prezente într-un mediu, ce pot avea activităţi foarte diferite, cantitativ sau calitativ faţă de activităţile însumate ale aceloraşi specii cultivate separat în mediul respectiv.

Asocierea a două specii realizează un efect pe care fiecare în parte nu-l poate realiza, adică sinteza unui produs sau degradarea unui substrat complex.

Asociaţia nu are un caracter obligatoriu, deoarece unul din membrii asociaţiei poate fi înlocuit cu altul, iar cele două organisme se pot dezvolta separat în mediul lor natural.

Relaţia sinergică este greu de diferenţiat de mutualism şi comensalism. Mai este descrisă sub denumirea de *sintrofism*. De exemplu, *E. coli* şi *S. faecalis* produc putrescina din arginină, numai dacă sunt cultivate împreună şi niciodată izolat. *Ps. aureofaciens* var. *nonliquefaciens* şi *Ps. fluorescens* au activitate lecitinazică numai dacă sunt cultivate împreună.

Mutualismul

Este o asociaţie reciproc benefică, o relaţie care prezintă diferite grade de la asocieri laxe, până la forme obligatorii, între microorganisme. Mutualismul este considerat ca o extensie a sinergismului. De exemplu, *Lactobacillus arabinosus* 17-5 necesită fenilalanina pentru creştere, iar *Str. faecalis R* necesită acid folic. Nu cresc pe un mediu minimal după cultivare separată, dar cultivate împreună furnizează culturi abundente. Fiecare specie sintetizează şi eliberează în mediu, factorul de creştere necesar celeilalte. Interacţiunea nu necesită contactul intim între celulele celor două specii, deoarece moleculele sintetizate şi eliberate sunt solubile şi dializabile.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Relaţiile mutuale caracterizează asociaţiile dintre bacterii şi alge în mediu marin. Bacteriile produc vitamina B_{12} necesară algelor, iar acestea elimină compuşi glucidici de fotosinteză şi CO_2.

Sintrofia

Sintrofia corespunde situaţiei în care unul sau mai multe microorganisme ale asociaţiei acţionează ca sursă de metaboliţi majori sau minori pe care îi folosesc împreună cu partenerii într-o relaţie de schimb metabolic (cross feeding). De exemplu, consorţiul de microorganisme strâns agregate (*S. lactis, S. cremoris, Leuconostoc dextranicus, B. kefir* şi levuri) participă la fermentaţia laptelui.

Interacţiuni negative

Sunt prezente în special la densităţi mari de microorganisme şi afectează viteza de creştere a uneia dintre populaţii. Interacţiunile negative includ:

- competiţia pentru un substrat disponibil;
- producerea de compuşi toxici de către una din populaţii cu efect nociv pentru alta;
- acumularea de metaboliţi cu efect inhibitor pentru alte specii (acizi organici, H_2S);
- parazitism sau prădare.

Competiţia

Are importanţă fundamentală pentru toate organismele din natură. Competiţia este rezultatul diversităţii microorganismelor, iar dezvoltarea lor depinde de fondul comun de resurse nutritive ale mediului.

Competiţia defineşte efectul negativ al unui organism asupra altuia, ca rezultat al epuizării unei surse din mediu (sursa de C, N, P, factori de creştere).

Au fost descrise două tipuri de competiţie:

1) *Competiţia interspecifică* defineşte interacţiunea negativă dintre două sau mai multe specii care diminuă sau inhibă creşterea uneia dintre ele. De exemplu, bacteriile din mediile naturale sunt mai bine adaptate decât cele alohtone.

2) *Competiţia intraspecifică* are loc între tulpini ale aceleiaşi specii. De exemplu, creşterea mai intensă a bacteriilor patogene virulente în culturi, în competiţie cu mutantele avirulente.

În relaţia de competiţie, influenţele adverse se realizează indirect. Competiţia între două specii de microorganisme diferite fiziologic, cu rate diferite de multiplicare, dar care necesită aceiaşi sursă de energie, duce la excluderea unuia dintre competitori. Competiţia avantajează microorganismul cu o rată mai mare de creştere, care decurge din eficienţa superioară de utilizare a nutrienţilor limitanţi şi din capacitatea de a sintetiza şi stoca substanţe de rezervă, precum şi factori de creştere. Prototrofele sunt avantajate faţă de auxotrofe.

Factorii abiotici ai mediului influenţează competiţia: pH, temperatura, concentraţia O_2, a sărurilor, toleranţa la desicaţie. De exemplu, la temperaturi scăzute sunt avantajate microorganismele psichrofile, care se multiplică cu rate mai mari, putând exclude pe cele psichrotrofe. La temperaturi mai ridicate, situaţia este inversă, fiind avantajate psichrotrofele.

Amensalismul

Este un tip de interacţiune negativă, întâlnită în comunităţile de microorganisme cu mari densităţi populaţionale. Amensalismul este caracterizat prin producerea de către o specie de microorganisme, a unor substanţe solubile organice (acizi graşi, etanol, toxine, enzime litice etc.) sau anorganice (H_2O_2, NH_3, NO^-_2, H_2S, O_2 etc.), care afectează negativ creşterea altor microorganisme asociate din mediu.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Amensalismul are un caracter unidirecțional, în sensul că o singură populație produce metaboliți toxici sau inhibitori.

Producerea de acizi organici sau anorganici modifică mediul natural, făcându-l inaccesibil microorganismelor sensibile. De exemplu, microorganismele autohtone de pe tegumentul uman produc acizi grași, care nu permit colonizarea acesteia de către bacteriile patogene.

Bacteriile sulf-oxidante (*Thiobacillus thiooxidans*) produc H_2SO_4, care scad valorile pH ale apelor de drenaj din mine la 1.0 - 2.0, condiții în care dezvoltarea microorganismelor acidosensibile este inhibată.

Producerea biogenă și acumularea H_2S în anaerobioză (în sedimentele din ape, în solurile inundate) inhibă microorganismele pentru care H_2S este toxic.

Amensalismul este un fenomen benefic pentru microorganismele producătoare de substanțe toxice sau cu rol inhibitor, deoarece le conferă avantaj competitiv. Populațiile sensibile sunt inhibate până la eliminarea lor din mediu.

Amensalismul și antagonismul au importanță ecologică deosebită pentru că determină distribuția și mărimea populațiilor de microorganisme. Fenomenul are și unele efecte benefice (de exemplu, eliminarea unor microorganisme pentru om, plante, și animale). Tehnicile de conservare a alimentelor prin acțiunea unor acizi (acetic, lactic, propionic) sau a etanolului se bazează pe același fenomen.

. Antibioza

Este fenomenul determinat de acțiunea unor compuși chimici produși de anumite microorganisme, care în concentrații mici au un efect inhibitor sau letal asupra altor organisme.

Antibioza a fost descoperită de Roberts (1874), care a descris sub denumirea de *antagonism*, efectul inhibitor exercitat de *Penicilium glaucum* asupra bacteriilor. Villemin (1889) a propus termenul de *antibiotic*, iar Fleming (1928), studiind antibioticul produs de *P. notatum* a deschis era aplicațiilor practice.

Multe microorganisme (eubacterii, actinomicete, fungi) produc mai multe antibiotice diferite (5-6), în proporții variabile, în funcție de natura mediului de cultivare și de condițiile de creștere.

Deși antibioticele sunt produse pe scară industrială, sunt puține probe directe care atestă producerea antibioticelor în mediile naturale și de aceea nu se poate afirma categoric rolul lor în ecologia microorganismelor. Datele referitoare la producerea antibioticelor *in vitro* nu pot fi extrapolate la condițiile din sol. În condițiile de laborator, inocularea unui număr mare de producători într-o probă de sol a dat rezultate pozitive dacă solul a fost în prealabil tratat termic sau dacă s-a adaugăt făină de soia.

Simbioza

Conceptul de simbioză definește "viața împreună" a unor organisme diferite, indiferent dacă asocierea lor are efect benefic sau dăunător asupra unuia sau ambilor parteneri.

În sens strict, termenul de simbioză denotă o coabitare de lungă durată, în cursul căreia două sau mai multe specii diferite trăiesc în relații spațiale directe, beneficiind reciproc din interacțiunile lor.

În sens strict, termenul de simbioză corespunde conceptului de mutualism. Unele simbioze sunt determinate de interrelația dintre două microorganisme sau între un microorganism și un macroorganism.

În funcție de localizarea microorganismelor simbionte se disting:

1) *ectosimbioze* - microorganismele rămân în afara celulelor și țesuturilor gazdei (bacteriile inclavate în teaca gelatinoasă a cianobacteriilor, pe suprafața frunzelor, în cavitățile corpului etc.;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) *endosimbioze* (endocitobioze), cele în care microorganismul simbiont este localizat în celulele şi /sau ţesuturile gazdei, în general un organism mai mare.

În funcţie de gradul de dependenţă se disting:

1) *simbioze facultative*. Cei doi parteneri pot exista în natură, liberi sau asociaţi. De exemplu, în prezenţa unor cantităţi adecvate de azot anorganic, bacteriile din g. *Rhizobium* şi plantele leguminoase se pot dezvolta separat. De asemenea, fungii din licheni pot fi cultivati *in vitro*.

2) *simbioze ecologic obligate* - de exemplu, bacteriile şi protozoarele din rumen care asigură degradarea celulozei la compuşi intermediari accesibili gazdei.

3) *simbioze efectiv obligate* (ereditare), în care cei doi parteneri nu au existenţă liberă în natură şi nu pot creşte independent *in vitro*. Este cazul unor nevertebrate marine care au nevoie absolută de alge endosimbiote.

În funcţie de natura relaţiei se disting:

a) *simbioze mutualiste*, când adaptarea ambelor organisme este superioară fiind împreună, decât atunci când trăiesc separat.

b) *simbioze parazitare*, când unul din parteneri este mai adaptat în asociaţie, decât când sunt separate.

După Dubois (1965), termenii de simbioză mutualistă sau parazitară implică în mod necesar o permanenţă a relaţiei, în care frecvent are un caracter dinamic. De exemplu, unele microorganisme parazitare cândva, au evoluat spre comensalism sau spre simbioze mutualiste sau invers, prin trecerea de la mutualism sau de la comensalism, la parazitism pâtogen (microbiota intestinală la organismele imunosupresate sau iradiate).

Realizarea simbiozei implică un anumit grad de permanenţă (persistenţa sa în cea mai mare parte a vieţii organismelor participante) şi o anumită specificitate (alegerea partenerului nu este întâmplatoare, ci se bazează pe un grad semnificativ de selectivitate). Aceste două particularităţi deosebesc simbioza de protocooperare.

Specificitatea este o proprietate condiţionată de particularităţi ale ambilor parteneri şi se bazează pe fenomene de recunoaştere reciprocă. Fiecare partener participă cu o serie de factori mai mult sau mai puţin critici pentru partenerul sau. Cu cât numărul factorilor care interacţionează este mai mare, cu atât gradul de specificitate simbiotică este mai mare. Specificitatea accentuată corespunde capacităţii de simbioză cu un spectru limitat de asociaţi. Specificitatea extremă poate determina limitarea unui organism la un singur partener gazdă sau la câţiva parteneri înrudiţi. Invers, specificitatea redusă este expresia unei promiscuităţi simbiotice excesive, reflectată prin capacitatea de asociere cu un număr mare de tulpini, specii şi genuri. De exemplu, fagii din micorize pot infecta un număr mare de specii diferite de plante. Menţinerea asociaţiei simbiotice este condiţionată de transmiterea eficientă de la o generaţie la alta. Pentru endosimbioze, transmiterea se face în mod direct sau prin infecţie.

Transmiterea directă corespunde situaţiei în care microorganismele trăiesc permanent în ţesuturile gazdei, trecând de la o generaţie la alta.

Transmiterea prin infecţie este întâlnită în cazul în care endosimbionţii rămân intracelular numai o parte din ciclul de viaţă a gazdei. Într-o anumită etapă, ei sunt eliberaţi în mediul extracelular, astfel încât fiecare generaţie a gazdei trebuie reinfectată cu simbionţi, care au temporar o existenţă liberă.

Adaptări consecutive simbiozei

Evoluţia simbiozei în timp este asociată cu modificări structurale, biochimice şi fiziologice, care furnizează caractere adaptative noi, utile pentru capacitatea organismelor asociate de a tolera condiţii de mediu noi, uneori extreme şi elimină o mare parte din organismele individuale. Specializarile apărute în timp, precum şi pierderile unor funcţii ale partenerilor măresc gradul de specificitate a relaţiei şi dependenţa reciprocă a celor doi parteneri.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Evoluția simbiozelor. Dyer (1984,1989) propune următoarea succesiune de etape prin care o asociere simbiotică se integrează treptat și devine progresiv "mai obligatorie":

1) Asocierea a două organisme heterospecifice care schimbă nutrienți cu un anumit avantaj selectiv. Cele două organisme se comportă mai bine în asociație, decât independent.

2) Presiunea selectivă asigură dezvoltarea armonioasă a celor doi parteneri, prin coordonarea activității metabolice și a ritmului de diviziune, astfel încât nici unul nu-l poate copleși pe celalalt.

3) Dispariția structurilor și funcțiilor redundante. Inițial, enzimele produse de unul din parteneri sunt pierdute de unul dintre ei, iar ulterior apar modificări structurale (de exemplu, simplificarea structurii parietale a cianobacteriilor endosimbiotice).

Simbioza foarte eficientă evoluează spre coordonare la nivel genetic. Selecția acționează prin codificarea coordonată a produselor genelor esențiale, ducând la pierderea autonomiei ambilor parteneri. Relația devine obligatorie și, în final, cele două genomuri asociate funcționează ca un genom mare, perfect coordonat.

Rolul endosimbiozei în geneza celulei eucariote

Ipoteza originii simbiotice a organitelor celulare a fost propusă 1850 de către Altman și formulată ulterior în diferite variante.

Cea mai cunoscută este ipoteza *simbiozei seriale* (Margulis, 1967, 1981) în acord cu care, mitocondriile, flagelii de tip eucariot, cloroplastele și microtubulii au fost la origine, bacterii libere, care au fost preluate prin endocitoza în asociere simbiotică, de o celulă ancestrală mai mare. Se presupune că ele au evitat digestia de către gazdă, obținând de la aceasta o serie de nutrienți esențiali, iar la rândul lor, furnizând excesul de sinteze.

Cu timpul, autonomia organismelor străine s-a pierdut progresiv, relația evoluând spre o asociere simbiotică, în care gazda a preluat întregul control. Esențial în acest proces a fost o modificare a sistemului genetic: o parte din determinanții genetici au fost translocați în genomul endosimbionților și încorporați în genomul nuclear al gazdei. Astfel, endosimbionții și-au pierdut statutul de organisme, dobândindu-l pe acela de organite. Ei și-au păstrat capacitatea de a se replica (evidențiată la mitocondrii), de a-și menține un genom propriu, care poate suferi modificări prin mutații. Procesul s-a realizat în etape succesive:

1) Formarea protomitocondriilor s-a realizat în momentul în care o bacterie gazdă heterotrofă facultativ anaerobă a înglobat o bacterie aerobă, posesoare a enzimelor ciclului Krebs.

2) Asocierea cu unele bacterii mobile anaerobe, asemănătoare spirochetelor actuale.

3) Endocitoza unor cianobacterii libere, etapă ce corespunde cianobacteriilor fotosintetizante.

Datorită acestor modificări, fenotipul unei plante este definit de trei sisteme genetice perfect integrate: cel nuclear propriu, genomul mitocondrial și genomul cloroplastelor. Din punct de vedere evolutiv, celula vegetală poate fi considerată ca rezultat al unei comunități formată din trei specii de bacterii intim asociate, care își coordonează activitățile, pentru a produce fenotipul caracteristic.

Semnificația biologică a simbiozelor

Organismele simbionte realizează un interschimb de nutrienți (factor esențial pentru interacțiunea partenerilor), protecție și dobândesc avantaje ecologice.

Avantajele nutriționale ale celor doi parteneri s-au demonstrat de cele mai multe ori. Produsele de fotosinteză sunt transferate totdeauna de la fototrofe la heterotrofe. Algele simbiotice elimină o cantitate mai mare de produși de fotosinteză decât echivalentele lor în stare liberă. Produsul de fotosinteză este eliberat în forma pe care partenerul heterotrof o poate utiliza în metabolismul propriu.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Simbiozele sunt foarte diversificate, ceea ce sugerează rolul lor benefic pentru partenerii simbionţi. Peste 150 de genuri de nevertebrate (*Protozoa, Coelenterata, Porifera, Plathelminthes, Nemethelminthes, Molusca*) adăpostesc endosimbionţi autotrofi (alge endozoice), ce pot fi grupaţi în trei categorii:

1) zooclorele - simbionţi ai algelor verzi cu nevertebratele de apă dulce şi câteva marine.

2) zooxantele - simbionţi ai algelor galben-brune cu nevertebratele marine.

3) cianele - cianobacterii simbionte cu protozoare de apă dulce.

Sonnenborn (1938) a descris un tip de *Paramecium*, denumit killer, care eliberează în apă un "principiu toxic", particular, factorul K, faţă de care este imun, dar are efect letal faţă de tulpinile sensibile. Factorul K este reprezentat de bacteria *Caedibacter taeniospiralis*, activă faţă de *P. aurelia*. Endosimbiontul bacterian nu a fost cultivat în afara protozoarului, dar poate fi transferat de la un protozoar la altul prin mediul extern.

Simbioze insecte – microorganisme

Insectele şi acarienii sunt adeseori asociaţi cu diferite microorganisme: bacterii, microfungi, protozoare. Gradul de asociere este diferit, de la contaminanţi temporari din mediu, până la asocieri ectosimbiotice constante localizate în structuri specializate de tipul invaginărilor deschise în lumenul extremităţii posterioare a intestinului mijlociu, sau ca endosimbiont complet izolat.

Prezenţa microorganismelor simbiotice este foarte raspândită, mai ales la organismele care hrănesc cu alimente incomplete: seva plantelor (săracă în compuşi cu azot), cereale depozitate, lemnul (bogat în lignină, celuloză, hemiceluloze şi sărac în compuşi cu azot), lâna, părul, penele (bogate în keratină şi sărace în vitamine), sângele şi serul sanguin uman şi animal (deficitare în vitamina B).

Simbionţii sunt absenţi la insectele hematofage cu metamorfoză completă, care, fiind omnivore în stadiul larvar şi hrănindu-se cu diferite resturi organice stochează cantităţi importante de vitamine factori de creştere, pe care le pot utiliza în diferite faze ale reproducerii. Ca urmare, flebotomii, ţânţarii, simulidele etc. nu conţin microorganisme simbiotice. Face excepţie *Culex pipiens fatigatus* care poartă simbionţi intracelulari, probabil de tip *Rickettsia,* în intestinul mijlociu. Prin contrast, insectele hematofage cu metamorfoză incompletă (*Pediculus, Cymex* sp., musca ţeţe), căpuşele şi acarienii au toate simbionţi în stadiul de nimfă, deşi intestinul lor este steril (Brookis, 1964).

Endosimbionţii sunt localizaţi în celule specializate sau chiar gigante, cu grad înalt de poliploidie, numite *bactericite* (când conţin bacterii) şi *micetocite* (când conţin fungi). Ele pot fi izolate şi dispersate sau formează structuri diferenţiate denumite *micetoame*, cu funcţia de a adăposti simbionţii.

Localizarea micetocitelor şi micetoamelor este foarte variată: în epiteliul intestinal şi simbionţii pot fi eliminaţi continuu în lumen; în ţesutul mezodermic subiacent, uneori în tot corpul. La gândaci şi la homoptere, micetocitele sunt răspândite în peretele intestinului mijlociu sau inclavate în corpul gras (un ţesut lax discontinuu, situat de-a lungul cavităţii corpului). La *Curculionidae (Apion pisi*), doi din cei 6 tubuli malpighieni au devenit micetoame sub forma unor distensii globulare.

Ectosimbioze

Capacitatea insectelor xilofage de a se dezvolta pe substratul lemnos (cu mare deficit de proteine, steroli, vitamine) este condiţionată de asocierea lor cu levuri şi mucegaiuri.

Interacţiunea cea mai simplă a insectelor cu fungii are loc în galeriile ce se formează după depunerea ouălor în ţesuturile vegetale (muguri, frunze sau tulpini). Probabil că insecta depune şi spori fungici care germinează şi cresc parazitar pe ţesutul galelor, formând un strat gros micelial, ce tapetează interiorul acestora.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Relaţia simbiotică este simplă: insecta asigură transmiterea fungilor într-un mediu protejat în care se dezvoltă, degradând ţesutul galei la compuşi ce pot fi utilizaţi de insecte. Acestea se hrănesc şi cu seva produsă de ţesutul vegetal lezat.

Fungii simbionţi furnizează gazdei vitamine, aminoacizi, factori de creştere (biotină, tiamină, acid pantotenic, mezoinozitol, acid folic, acid nicotinic etc.) sau îmbogăţesc echipamentul enzimatic al gazdei: amilaze, celulaze, pectinaze, hemicelulaze, lipaze, proteaze, care măresc capacitatea acestora de a degrada unele substanţe neobişnuite.

Simbiozele fixatoare de N_2

Simbioza Rhizobium-plante leguminoase

Aproximativ 1200 de specii de plante leguminoase, din cele 12-14000 existente sunt capabile să stabilească simbioze cu bacteriile fixatoare de N_2: o parte din membrii familiilor *Mimosaceae* şi *Papilionaceae (Fabaceae)* şi 30% dintre *Caesalpinaceae*. Excepţia o constituie *Trema cannabina* (*Ulmaceae*). Probabil că simbioza diazotrofă a fost o proprietate generală a leguminoaselor, pierdută de unele genuri şi specii după divergenţa evolutivă a celor trei familii.

Leguminoasele au seminţe bogate în proteine (circa 25%), comparativ cu grâul (circa 1o%) şi nevoia suplimentară de azot a fost, în cursul evoluţiei, unul din factorii care au stimulat asocierea fixatorilor de N_2 cu aceste plante.

Simbiontul bacterian. Celulele de *Rhizobium* sunt prezente în sol în număr variabil, în funcţie de condiţiile locale: $10^2 - 10^5$/g în solul recent cultivat, lipsit de plante, $10^5 - 10^8$/g sol în prezenţa plantelor şi $10^6 - 10^{11}$ în rizosfera de trifoi.

În funcţie de viteza cu care cresc în culturi axenice au fost descrise două categorii de bacterii simbiontice: a) bacteriile care se multiplică rapid, cu durata unei generaţii de circa 6 ore (*R. leguminosarum, R. trifolii,R.phaseoli, R.meliloti);* b) bacteriile cu ritm lent de multiplicare din *g. Bradyrhizobium (B. japonicum*), care infectează *Glycine max* (soia) şi *Vigna sinensis*. Ele produc trei tipuri de polizaharide: exopolizaharide, polizaharide capsulare şi lipopolizaharide, cu rol în aderenţa celulelor bacteriene la suprafaţa radiculară şi în asigurarea specificităţii de gazdă.

Specificitatea interacţiunii dintre bacterii şi plante este consecinţa unor fenomene de control ce se petrec la mai multe nivele:

1) dezvoltarea tulpinilor de *Rhizobium* în rizosfera leguminoaselor, controlat de ambii parteneri ai simbiozei;

2) controlul legării bacteriilor de perii radiculari

3) deformarea perilor radiculari, efect foarte specific controlat de ambii parteneri;

4) infectarea perilor radiculari şi formarea cordonului de infecţie, de asemenea, un proces foarte selectiv;

5) evoluţia abortivă a infecţiilor neadecvate.

Multiplicitatea acestor mecanisme care acţionează sinergic face posibil ca nici unul dintre ele să nu aibă specificitate absolută.

Specificitatea relativă a interacţiunii dintre bacterii şi plante stă la baza celor 6 grupuri de inoculare crucisată:

1) grupul *Pisum*, infectat de *R.leguminosarum*, include specii de *Vicia, Lathyrus, Lens*;

2) grupul *Trifolium*, include speciile de trifoi, infectate de *R.trifolii*;

3) grupul *Glycine*, infectat numai de *Bradyrhizobium japonicum*;

4) grupul *Medicago*, cu specii de *Melilotus, Trigonella*, infectate de *R. meliloti*;

5) grupul *Phaseolus* include specii de fasole infectate de *R. phaseoli*;

6) grupul *Lupinus - Vigna - Lotus*, infectat de *R. lupini*.

Natura constituienţilor implicaţi în recunoaşterea specifică este controversată, dar un rol important în interacţiunea specifică a celor doi parteneri este atribuit *lectinelor*.

Lectinele sunt glicoproteine produse de plante şi animale, cu afinităţi specifice de legare. Datorită capacităţii lor de a aglutina hematiile şi datorită originii lor vegetale (iniţial au fost

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

izolate de la *Ricinus communis*) s-au denumit *fitohemaglutinine*. Denumirea generică de lectine vine de la latinescul *legere* (a alege, a selecta) şi reflectă proprietatea selectivă de legare.

Lectinele ar deplini următoarele funcţii:

- funcţia de anticorpi ai plantelor, cu rolul de a neutraliza microorganismele patogene din sol;
- rol în transportul şi/sau stocarea glucidelor plante;
- rol în organizarea glicopeptidelor cu activitate enzimatică în sisteme multienzimatice;
- rol în diferenţierea celulelor şi în recunoaşterea intercelulară;
- asigurarea specificităţii de legare *Rhizobium* - leguminoase.

Lectinele sunt localizate la nivelul perilor absorbanţi sub forma unor "petice" mici, dense, la extremitatea acestora.

Receptorii de lectine de pe suprafaţa bacteriilor sunt de natură glucidică şi sunt localizaţi pe polizaharidele capsulare şi extracapsulare sau pe lipopolizaharide.

Specificitatea interacţiunii dintre bacterii şi leguminoase a permis definirea taxonomiei g. *Rhizobium* şi pe de altă parte, pe aceea a grupelor de inoculare încrucişată. Plantele unui grup produc lectine similare.

Interacţiunea *Rhizobium*/leguminoase implică existenţa unor fenomene de compatibilitate între cei doi parteneri, iar incompatibilitatea limitează infecţia.

Polizaharidele bacteriene sunt foarte importante pentru iniţierea procesului de infecţie. Mutantele necapsulate nu produc deformarea perilor radiculari.

Primul eveniment vizibil după contactul bacterie-rădacină este deformarea şi răsucirea (curbarea) perilor. Deşi celulele de *Rhizobium* interacţionează cu toţi perii radiculari, numai circa 25% sunt deformaţi efectiv, printr-un proces de stimulare locală a creşterii. Deformarea este produsă numai de tulpina bacteriană omologă, ceea ce denotă caracterul de specificitate al acestei faze.

Celulele de *Rhizobium* sunt atrase (chimiotactism pozitiv) în rizosferă, de flavonoidele capabile să inducă exprimarea genelor *nod*. În prezenţa exudatului radicular şi a flavonoidului *luteolina*, *Rhizobium* sintetizează şi excretă un factor extracelular, produs al genelor *nod*. Factorul a fost identificat la *R. meliloti* ca tetrazaharid al D-glucozaminci, sulfatat β-1,4 în care grupele amino sunt acetilate, iar una este acilată cu un acid gras C_{16}.

Formarea nodozităţilor

Nodozităţile sunt rezultatul multiplicării şi hipertrofiei anormale, dar limitate, a celulelor corticale stimulate de infecţia cu *Rhizobium*. Nodozităţile asigură condiţiile necesare fixării N_2, furnizând sistemul vascular prin care apa, sărurile, sursa de carbon din plantă devin disponibile pentru fixarea N_2 şi pentru alte procese metabolice ale celor doi simbioniţi.

Inducţia formării nodozităţii implică o interacţiune complexă între *Rhizobium* şi planta gazdă specifică, ce evoluează în mai multe etape.

Concomitent sau la scurt timp după iniţierea formării cordonului infecţios, celulele corticale complet diferenţiate (care în mod normal nu se divid) încep să se multiplice, stimulate fiind de substanţele produse de bacterii. Genele pentru nodulare (*nod*) de la *Rhizobium* sunt activate de molecule mici din categoria hidroxiflavonelor, sintetizate de plantă.

Rolfe şi colab. (1986) au stabilit următoarele etape în formarea nodozităţilor la trifoi:

1) bacteriile din rizosferă răspund la compuşii secretaţi de plantă, care stimulează exprimarea genelor de nodulare, eliberând o serie de substanţe care induc deformarea perilor radiculari şi sinteza receptorilor specifici de legare a lectinelor de pe suprafaţa celulelor vegetale;

2) după legarea de perii radiculari, celula de *Rhizobium* străbate peretele celular al acestora în circa 24 ore de la expunere.

Nucleul celulei infectate migrează spre situsul parietal de pătrundere. Bacteriile protejate de polizaharidele extracelulare înaintează spre cortex, în interiorul cordonului de infecţie în care

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

se multiplică. Cordonul infecțios este o structură tubulară, derivată din celula gazdă, prin care bacteriile dispuse în șir unic traversează celulele radiculare pentru a ajunge de la suprafața părului absorbant, în cortex, la nivelul primordiului nodozității.

Morfologia nodozității

Infecția cu *Rhizobium* declanșează activitatea mitotică a celulelor cortexului radicular, rezultatul fiind formarea nodozității caracteristice cu o structură diferențiată zonal.

Regiunea *periferică* este reprezentată de cortexul nodozității, format din mai multe straturi de celule diploide și este străbătută de fascicule vasculare rudimentare.

Zona *meristematică*, situată în regiunea distală a nodozității este formată din celule diploide neinfectate. Prin diviziune, ele asigură creșterea nodozității, dar și forma ei (meristemele emisferice generează nodozități sferice, cele apicale - nodozități alungite, iar cele bifurcate - nodozități ramificate).

Regiunea *centrală* este alcătuită din trei zone distincte, ce se succed de la zona meristematică spre baza nodozității, legată de părul absorbant:

- zona de invazie, adiacentă meristemului este formată din celule neinfectate, care au endocitat bacterii eliberate din cordonul infecțios;
- zona simbiotică ocupă porțiunea majoră și este alcătuită din două subzone: a) zona simbiotică timpurie conține celule gazdă alungite (38-62 μm) și bacterii care încă mai proliferează; b) zona simbiotică tardivă conține celule gazdă hipertrofiate, poliploide, încărcate cu bacterii diferențiate la stadiul de bacteroizi. Celulele gazdă au nucleu hipertrofiat, un număr mare de mitocondrii, plastide și poliribosomi;
- regiunea de senescență, caracteristică nodozităților bătrâne corespunde celulelor vegetale și bacteroizilor în curs de degenerare sau moarte.

Eliberarea bacteriilor din cordonul infecțios

După ce filamentul infecțios a străbatut o serie de straturi ale cortexului radicular, bacteriile sunt eliberate fie în spațiile intercelulare, fie în interiorul celulelor meristematice ale viitoarei nodozități. Bacteriile eliberate sunt delimitate de o membrană peribacteroidiană.

După eliberarea din cordonul infecțios în citoplasma celulei vegetale, celulele de *Rhizobium* se diferențiază în forme endosimbiotice - *bacteroizi* - care fixează N_2. Numărul bacteroizilor/celulă vegetală este variabil (circa 1ooo la *R. trifolii* - deoarece multiplicarea încetează relativ timpuriu după infecție și 3 - 4 x $1o^4$ în sistemul *B. japonicum*/soia)

Bacteroizii sunt celule cu un perete celular subțire și mai puțin rigid, modificare care favorizează trecerea nutrienților din citosolul vegetal în bacteroid și a NH_4^+ în sens invers. Volumul lor depășește de câteva zeci de ori pe acela al celulelor libere, iar forma este sferică, poliedrică, piriformă sau de litera Y. Bacteroizii sunt celule specializate funcțional: conțin complexul enzimatic al nitrogenezei, leghemoglobină, rezerve mari de poli-β-hidroxibutirat și glicogen. După eliberarea în sol din nodozitățile senescente, bacteroizii revin la forma bacilară și pot relua multiplicarea. Stadiul de endosimbiont reprezintă numai o fază a ciclului de viață.

Fiziologia nodozității

Celulele de *Rhizobium*, libere, în absența interacțiunii cu plantele leguminoase nu conțin nitrogenază și nu fixează N_2.

Procesul fixării N_2 este energo-intensiv, iar plantele furnizează sursa de energie și de putere reducătoare. Compușii cu carbon, proveniți din plantă, furnizează nu numai energia necesară, ci și structurile chimice care leagă azotul fixat.

Compusul major transportat din plantă la nodozitate este zaharoza, care este în prealabil hidrolizată de o invertază de origine vegetală. Sistemul fixator de azot în perioada de activitate

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

maximă, utilizează circa 22% din cantitatea netă de fotosintat produs de plantă. Bacteroizii conţin sistemul enzimatic - nitrogenaza - codificat de genele *nif*, singurul capabil să reducă N_2 la la NH_4^+. Produsul final al fixării este NH_3, care este excretat de bacteroizi în citosolul vegetal, unde este convertit la glutamină, asparagină şi o serie de alţi aminoacizi. Procesul implică reacţiile cuplate ale *glutamin-sintetazei* şi *glutamat-sintazei*, a căror concentraţie în nodozităţi este de câteva ori mai mare decât în rădăcină.

N_2 redus la NH_3 este preluat de glutamin-sintetaza, care transferă gruparea amino, fie la aspartat cu formare de asparagină, fie la α-cetoglutarat (rezultat în ciclul Krebs din glucoză) pentru a forma glutamat. Asparagina, glutamina şi gluatmatul reprezintă surse importante de azot pentru plante.

Simbiozele asociative. Fixarea azotului în rizosferă

Rizocenozele sunt asocieri cu diferite grade de interacţiune între unele bacterii libere fixatoare de azot şi diferite specii de plante. Tarrand şi colab. (1978) le-au reunit în g. *Azospirillum*.

Rizosfera unui număr mare de graminee spontane sau a unor plante de cultură reprezintă un habitat ideal pentru dezvoltarea bacteriilor heterotrofe fixatoare de azot. Substanţele organice provenite din resturile celulelor radiculare şi exudatele solubile ale rădăcinii sunt preluate de bacteriile simbiotice, ca sursă de carbon şi energie. Cele mai studiate sunt asocierile bacteriene descrise la porumb, grâu, orz, trestia de zahăr, precum şi la o serie de graminee furajere tropicale.

Microorganismele implicate în acest tip de simbioze sunt: *Azospirillum lipoferum, A.brasilense, A.amazonense, A.halopraeferans, Azotobacter paspali, Beijerinckia sp., Campylobacter sp.*

Asociaţiile au un anumit grad de selectivitate, în sensul că rădăcinile unor plante ar elimina substanţe care, recunoscute de bacterii, ar favoriza aderenţa lor preferenţială de perii radiculari. Aşa se explică simbioza asociativă dintre *A.paspali* şi planta *Paspalum notatum*.

Interacţiunile asociative nu ating niciodată complexitatea simbiozei *Rhizobium*-plante leguminoase. *A. paspali* formează un manşon în jurul rădăcinilor plantei, fiind protejate de o teacă mucilaginoasă. *A. lipoferum* se găseşte pe rădăcinile de porumb, iar *A. brasilense*, pe cele de grâu şi orez. Bacteriile străpung epiderma radiculară şi infectează celulele corticale ale rădăcinii şi se localizează chiar în celulele corticale superficiale ale rădăcinii sau se localizează chiar în ţesuturile corticale şi vasculare fără să formeze structuri diferenţiate.

Cu excepţia orezului, toate plantele tropicale asociate cu bacterii fixatoare de azot fac fotosinteza de tip C_4. Produsul primar al fotosintezei lor este malatul, sursa optimă de carbon pentru bacterii. Bacteriile lipsesc din rizosfera unui număr limitat de plante C_4, care, probabil produc compuşi antibacterieni. Plantele cu fotosinteză de tip C_4, utilizează cu maximă eficienţă CO_2 ca şi lumina intensă şi spre deosebire de plantele cu fotosinteză de tip C_4 exudează cantităţi importante de carbon organic prin rădăcini, asigurând un substrat eficient bacteriilor heterotrofe. Fiziologia plantei este foarte importantă pentru activitatea nitrogenazică şi se consideră că numai plantele care exudează cantităţi mari de compuşi metabolizabili au valoare agronomică.

Rolul simbiozelor asociative este deosebit de important în regiunile tropicale, unde menţin fertilitatea solului în absenţa îngrăşămintelor azotate.

Eficienţa acestor asociaţii este limitată de lipsa unor sisteme specializate de transport care să asigure aprovizionarea bacteriilor cu substrat energetic, precum şi exportul produselor fixării N_2.

Actinorizele. Simbioza Frankia-angiosperme neleguminoase

Actinorizele reprezintă asociaţii simbiotice fixatoare de azot la cel puţin 200 de specii de angiosperme, aparţinând la 15 genuri şi respectiv la 7 familii. Ele includ plante lemnoase,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

caracteristice zonelor cu deficit de azot combinat. Simbiontul aparţine unui gen nou de actinomicete - *Frankia* - ce se găseşte în rizosfera plantelor şi este capabil să le infecteze.

Relaţia implică un grad important de specificitate. S-au descris 10 specii de actimonicete specifice pentru diferite plante gazdă: *F. alni (Alnus), F. brunchorsti (Myrica), F. casuarinae (Casuarina), F. ceanothi (Ceanothus), F. cercocarpi (Cercocarpus), F. coriariae (Coriaria), F. discardiae (Discaria), F. dryadis (Drias), F. elaeagni (Elaeagnus)* şi *F. purshiae (Purshia)*.

Studiul interacţiunii actinomicetelor cu plantele gazdă, efectuat în principal pe *Alnus glutinosa, Myrica gale* şi *Casuarina cunninghamiana* a evidenţiat trei stadii de evoluţie structurală şi metabolică a microsimbiontului.

Faza de invazie corespunde stadiului în care *Frankia* sp., cu structură filamentoasă de tip hifal, ramificată şi septată infectează celulele corticale. Stadiul hifal persistă în celulele corticale ale nodozităţii primare timp de 2 - 3 săptămâni, formând în celulele infectate o masă densă de filamente perinucleare.

Formarea veziculelor corespunde stadiului al doilea de dezvoltare a simbiontului. La terminaţiile hifelor apar dilatări care iau forma sferică sau de măciucă. Veziculele cu diametrul de 3-5 μm, treptat, ocupă toată zona centrală a celulelor corticale. Apariţia lor este corelată cu debutul activităţii nitrogenazei.

Formarea sporangilor şi a sporilor. Aceste structuri sunt echivalenţii funcţionali ai sporilor şi apar prin diferenţierea veziculelor, din care se formează sporangii. Sporii se formează prin compartimentarea septală a veziculelor. Sporii maturi au formă sferică sau ovalară, cu diametrul de 1,0-5,0 μm. Sporii se găsesc în celulele vegetale care şi-au încheiat ciclul de viaţă şi sunt eliberaţi după moartea acestora. În nodozităţile senescente şi în sol, sporii reprezintă forme de latenţă. O parte din spori îşi păstrează capacitatea de germinare *in vitro* şi *in vivo*.

Randamentul fixării N_2 în actinorizele simbiotice este comparabil cu acela al simbiozelor leguminoase. Azotul fixat este transportat în plantă şi apoi revine în sol prin litieră sau prin intermediul rădăcinilor care mor. Cele mai multe plante gazdă ale actinorizelor sunt specii „pionier", care populează terenuri cu deficit foarte mare al azotului combinat (terenuri mlăştinoase, dune de nisip, pietriş, cenuşi vulcanice, bălţi sărate, soiuri de pădure tropicală, zone deşertice).

Plantele cu actinorize au o răspândire largă în regiunile temperate, arctice, subalpine, şes, subtropicale şi tropicale. Natura perenă a plantelor creează o sursă de azot combinat pe termen lung pentru fertilizarea acestor soiuri.

Cianobacterii fixatoare de azot. Simbioza Azolla-Anabaena azollae

Cianobacteria *A.azollae* este raspândită la toate speciile ferigilor aquatice din g. *Azolla*. Cianobacteria este iniţial asociată cu meristemul apical al plantei şi este capturată ulterior, pe măsură ce se dezvoltă primordiile frunzelor,în cavităţile formate pe lobii dorsali ai acestora. Asociaţia este mutual benefică. Cianobiontul este protejat, fixează N_2 atmosferic şi îl cedează gazdei. Planta furnizează sursa de carbon, probabil maltoza. Randamentul fixării N_2 este evaluat la circa 120 kg N/ha/an, iar în condiţii foarte favorabile ajunge până la 670 kg N/ha/an.

Simbioza cianobacterii-fungi sau alge-fungi (Lichenii)

Lichenii sunt produsul asocierii simbiotice a două microorganisme înrudite: un producător primar (o cianobacterie sau o algă - adică un ficobiont) şi un consumator - un tip de fungi (micobiont). Forma complet integrată dă naştere unei noi entităţi biologice, fără nici o asemănare cu componenţii săi individuali.

Asocierea are drept consecinţă o serie de modificări structurale, biochimice şi fiziologice, care facilitează interacţiunea şi care sunt esenţiale pentru diferenţierea morfologică şi pentru asigurarea stabilităţii asociaţiei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cei doi sau trei parteneri ai asociației formează un corp vegetativ – talul - având o structură macro- şi microscopică cu caracteristici proprii " speciei".

Cea mai mare parte a talului este alcătuită din hifele fungice, care formează un strat de țesut specializat, rezultat din împletirea strânsă a hifelor - *cortexul superior*, sub care se găsesc o *regiune medulară* şi adeseori, un *cortex inferior, hipotal* şi *rizine*.

Regiunea medulară constă dintr-o împletitură laxă a hifelor, în ochiurile căreia se găseşte stratul algal. Aici se stabileşte contactul fizic dintre partenerii simbiozei.

Lichenii *crustoşi* nu au niciodată cortex inferior, fiind ataşați de substrat.

Lichenii se înmulțesc pe cale vegetativă prin fragmente de tal, *soredii* (structuri alcătuite din celule algale înconjurate de hife fungice) sau *izidii* (alcătuite din celule algale şi țesut medular acoperit de cortex).

Alga se multiplică în stratul algal prin diviziune mitotică şi prin aplanospori, eliberați prin ruperea peretelui celulei mamă.

Fungii din licheni se înmulțesc prin ascospori asexuați, după ce sunt eliberați din tal. Ei aparțin clasei *Ascomycetes* şi mai puțin clasei *Basidiomycetes*. Izolați, cresc greu în culturi de laborator, cu o incubație uneori de câteva luni.

O serie de alge poate forma licheni cu orice altă specie fungică compatibilă şi invers. Există totuşi un anumit grad de selectivitate între micobiont şi ficobiont, în sensul unei interacțiuni preferențiale, bazată tot pe fenomene de recunoaştere.

Ficobiontul reprezintă sursa principală de carbon organic. Excedentul este cedat fungilor. Fotosinteza algală are o rată scazută. Algele conțin de 4–10 ori mai puțină clorofilă per unitate de greutate față de celulele din frunzele verzi.

Lichenii au două surse de azot: organic sau anorganic absorbit din mediu şi cel fixat de cianobacterii. Lichenii cu cianobacterii fixatoare de azot sunt mai bogați în azot.

Fungii au o mare capacitate de absorbție a apei, fie rapid (când este în stare lichidă), fie lent (apa sub formă de vapori).

Lichenii au rate de creştere foarte scăzute. În regiunile temperate, creşterea radială este de 1-2 mm/an, iar la speciile rapid crescătoare, de 2-4,5 mm/an. În regiunile antarctice nu apare nici un indiciu al creşterii timp de 30 de ani.

Pe medii agarizate, cu substanțe organice, cei doi parteneri cresc independent unul de celălalt. În condițiile unor concentrații minime de nutrienți sau în absența lor (pe medii cu agar fără adaus de nutrienți) se observă un proces de lichenizare, evidențiat prin încercuirea algelor de către hifele fungice, formarea haustorilor fungici sau apariția unui țesut pseudo-parenchimatos, prin dispunerea hifelor în jurul unui grup de alge.

Concluzia acestor experimente preliminarii este că asocierea simbionților din licheni nu are loc niciodată în condiții care permit creşterea independentă a unuia sau ambilor parteneri.

Asocierea simbionților ar depinde de creşterea echilibrată a algelor şi fungilor în condițiile unui substrat sărac în nutrienți, alternanța uscăciune/umiditate, absența poluanților. Creşterea dezechilibrată a unuia din simbionți duce la separarea lor.

Lichenii au capacitatea de a sintetiza o serie de metaboliți secundari specifici, denumiți "substanțele lichenilor". Sunt peste 220 de compuşi organici extracelulari, ce acoperă suprafața peretelui celular al hifelor, heterogeni din punct de vedere chimic, insolubili în apă, dar solubili în solvenți organici. Sinteza lor are loc în treptele metabolismului glucidic.

Lichenii reprezintă simbioza cu cel mai înalt grad de integrare din natură. Integrarea creează structuri noi şi se sintetizează metaboliți care nu sunt produşi niciodată de componenții individuali.

Botnariuc (1979) aderă la ideea că lichenii pot fi considerați ca un exemplu de speciație prin mutualism. Specialiştii din domeniul ecologiei microorganismelor consideră că lichenii au atins ultima treaptă în evoluția sistemelor simbiotice - aceea de unitate funcțională, *de organism unic*, cu cel mai înalt grad de integrare, datorită persistenței separate a celor două organisme, care pot fi disociate, cultivate separat şi reasociate natural sau artificial (experimental). Se consideră că lichenii se comportă mai degrabă ca un simbiont ecologic decât ca un simbiont fiziologic (Brock,1966).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În realitate, lichenii ca grup prezintă stadii de evoluție de la parazitism spre mutualism. În lichenii primitivi, fungii pătrund efectiv în celulele algale şi sunt, în esență, paraziți pe acestea. La speciile diferențiate, hifele fungice nu rup peretele celulei algale şi trăiesc în armonie cu acestea, fie în contact strâns, fără să pătrundă în interiorul lor. Lichenii pot fi considerați ca un caz de parazitism controlat, în care algele au dezvoltat un anumit grad de rezistență la fungi (Ahmadjian, 1982).

Micorizele

Micorizele reprezintă rezultatul asociației simbiotice, în cursul căreia radicelele celor mai multe plante sunt colonizate de fungi specifici.

Interrelația implică:

- asocierea relativ constantă a celor doi parteneri;
- infecția „normală" a plantelor de către fungi, în absența simptomelor patologice;
- invadarea exclusivă a cortexului radicular şi menținerea sterilității meristemului apical şi a cilindrului vascular.

Micorizele sunt foarte larg răspândite în natură, peste 80% din taxonii studiați fiind purtători de micorize, prezența unor plante neinfectate fiind mai curând excepții. Micorizele lipsesc la *Centrosperme, Plumbaginales, Cruciferae, Farinosae, Cyperales, Caryophylaceae*, toate producătoare de substanțe antifungice. Lipsesc deasemenea la *Filicales*, la plantele aquatice şi la cele care populează solurile mlăştinoase (*Droseraceae, Oenotheraceae, Halorrhagaceae*, etc.)

Clasificarea cea mai frecventă se bazează pe raportul dintre hifele fungice şi celulele corticale ale rădăcinii. Pe baza acestor criterii, micorizele aparțin următoarelor categorii:

- *ectomicorize* (micorize ectotrofe), în care fungii produc infecții hifale intercelulare
- *endomicorize* (micorize endotrofe), cu localizare intracelulară a hifelor
- *ectoendomicorize*, incluzând ambele tipuri de infecție
- micorize *peritrofe*.

Aceste tipuri de micorize sunt determinate de caracterele genetice ale plantelor. Micorizele sunt structuri dinamice. Ele prezintă stadii succesive de dezvoltare, de senescență.

Ectomicorizele

Sunt asociații simbiotice rezultate din interacțiunea miceliilor fungice cu rădăcinile plantelor, în care fungii ramân permanent localizați extra- şi intracelular. Ectomicorizele sunt foarte larg raspândite. Plantele gazdă sunt arborii de pădure în soluri brune sau podzolizate şi mai rare la arborii izolați în solurile agricole. S-au descris la *Pinaceae, Fagales, Juglandales, Myrtaceae, Tiliaceae*, etc.

Fungii de ectomicorize aparțin claselor: *Basidiomycetes* evoluate (ciuperci cu pălărie), *Ascomycetes* (trufe) şi *Phycomycetes*: *Amanita muscaria, Boletus edulis, Lactarius deliciosus* sp., *Rhizobium* sp., *Russula* sp., *Tuber* sp., etc.

Fungii din ectomicorize sunt dependenți de glucidele simple şi de alți nutrienți eliminați la suprafața rădăcinilor (acizi organici, aminoacizi, vitamine, factori stimulatori de creştere). Din această cauză, în stare liberă, fungii din micorize sunt necompetitivi cu fungii din sol. Se pare că odată cu diminuarea severă a glucidelor din sol, fungii pot manifesta tendința de a pătrunde în celulele radiculare, evoluând spre producerea de micorize *ectoendotrofe*.

Fungii din ectomicorize nu degradează lignina şi sunt slab celulozolitici.

Specificitatea interacțiunii celor doi parteneri este foarte diferită: unii au o mare specificitate de gazdă, iar alții au un spectru larg de gazdă, putând infecta arbori ce aparțin unor genuri diferite.

Uneori aceiaşi plantă este infectată de mai multe specii de fungi.

Hifele fungice infectante provenite din sporii germinați cresc rapid în rizosferă, stimulate fiind de exudatul radicular şi formează un manşon radicular. Inhibitorii din exudat îi împiedică să inițieze o stare patologică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fungii pătrund la nivelul rădăcinilor tinere, sensibile la atac, prin zona de infecție a micorizelor. Fungii de micorize nu invadează meristemul, datorită „imunității" lui și pentru că este constant reînnoit, având o poziție temporară prin deplasarea sa permanentă în substrat.

Pe măsură ce celulele rădăcinii infectate se divid și se alungesc, auxina secretată de fungi modifică dezvoltarea rădăcinii. Perii radiculari nu se mai dezvoltă, iar cei infectioși, rămași mai scurți, se ramifică.

Teaca sau manșonul fungic formează un țesut fungic gros, pseudoparenchimatos, care acoperă radicelele plantei gazdă. Teaca este un sistem complicat, ramificat, întrețesut, dezvoltat din hifele care pătrund între celulele epidermei și chiar între celulele cortexului radicular. Teaca asigură o mare suprafață de contact între cei doi simbionți, fără ca hifele să pătrundă în celulele vii. Ele secretă enzime pectinolitice, cu ajutorul cărora pot pătrunde între celulele cortexului.

Teaca fungică se conectează cu solul printr-o rețea luxuriantă de hife ramificate sau lanțuri hifale, denumite *rizomorfe*. În condiții favorabile, rizomorfele se diferențiază formând corpuri sporifere (corpi de fructificare), a căror nutriție este asigurată de planta gazdă. Apariția corpilor sporiferi este împiedicată dacă se întrerupe legătura dintre rizoforme și rădăcinile arborilor gazdă. Aceasta demonstrează că majoritatea ciupercilor comestibile prezente în apropierea copacilor sunt corpuri sporifere ale fungilor de ectomicorize și nu saprofite pe materia organică în descompunere. Pătrunderea hifelor în rădăcinile arborilor este o precondiție a acestor sporofori în condiții naturale, ceea ce explică apropierea anumitor fungi de speciile specifice de arbori.

Trăsătura distinctivă a micorizelor este *rețeaua Hartig*, o rețea de hife ce pătrund printre celulele corticale, fără să producă infecții intracelulare.

Endomicorizele. Micorizele veziculo-arbusculare

Acestea sunt tipul cel mai comun de micorize, întâlnit la cele mai multe plante cultivate. Sunt prezente la majoritatea angiospermelor: toate speciile lemnoase ce nu fac ectomicorize și mii de plante ierboase.

Endomicorizele veziculo-arbusculare se găsesc la mai multe genuri de gimnosperme care includ: *Cupressus, Thuja, Taxodium, Sequoia, Juniperus*, etc. Cele mai studiate sunt micorizele plantelor cu importanță economică (grâu, porumb, soia, mazăre, tomate, căpșuni, măr, piersic, graminee furajere, trestie de zăhăr, arborii de cafea, ceai, cauciuc, etc.).

Fungii care produc endomicorize sunt larg răspândiți în sol, mai ales în regiunea periradiculară și în rizosferă. Majoritatea cresc în culturi pure. Marea asemănare anatomică a micorizelor veziculo-arbusculare duce la presupunerea că majoritatea, dacă nu toate, sunt produse de o specie unică de fungi (Mosse, 1973). Apoi s-au descris mai multe specii de *Endogone* și alte câteva genuri: *Glomus*, *Sclerocystis, Gigaspora, Acaulospora*. Cei mai mulți fungi de endomicoriză au un spectru larg de gazdă.

Formarea micorizelor veziculo-arbusculare. Denumirea acestor micorize endotrofe derivă din faptul că ele formează structuri sferice denumite *vezicule* și structuri ramificate cu funcția de organ absorbtiv de tipul haustorilor, denumite *arbusculi*. În evoluția infecției simbiotice s-au descris trei faze succesive:

- dezvoltarea extensivă în sol a miceliului extraradicular, cel puțin câțiva centimetri la suprafața rădăcinii;
- apariția unui sistem hifal intercelular în cortex;
- infecția intracelulară și formarea de hife încolăcite, vezicule și arbusculi în celulele vegetale.

Inițial, fungii cresc sub formă de hife individuale sau de rețele laxe pe suprafața rădăcinilor pe care le colonizează, fie formând *apresori*, fie ramificându-se pentru a forma o diseminare de preinfecție de la care se formează apresori ce stimulează infecția. Infecția este favorizată de producerea de către fungi, a unor enzime celulozolitice, ce dizolvă mici porțiuni din peretele celulelor vegetale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Arbusculii sunt sisteme complexe structural şi funcţional, similare haustorilor, formate prin ramificarea dihotomică repetată a hifelor în celulele corticale. Arbusculii sunt progresiv capsulaţi într-un sistem de pereţi derivaţi din celula gazdă, pentru a forma structurile numite iniţial *sporangiole*.

Celulele infectate cu arbusculi au un volum mărit de până la 4–5 ori. Arbusculii au o durată de viaţă limitată (4 –10 zile) după care se lizează.

Veziculele sunt structuri saciforme ce apar la extremităţile sau la mijlocul hifelor distributive. În stadiile tinere au un perete subţire şi citoplasmă omogenă. Ulterior peretele devine gros, citoplasma vacuolată cu incluzii lipidice.

Fungii de micorize endotrofe atacă planta gazdă ca un parazit, deoarece hifele intracelulare se comportă ca haustorii fungilor patogeni. Fungii rămân localizaţi în straturile externe ale cortexului radicular. Când încearcă să pătrundă în structurile interne ale rădăcinii, ei sunt distruşi de factorii protectori ai gazdei, care determină dezintegrarea hifelor sau a arbusculilor. Prin liza hifelor endofitului, planta obţine compuşi organici fungici.

În mod normal, stelul şi meristemul apical sunt lipsite de infecţia fungică. Endodermul plantei reprezintă, pentru fungi, o barieră insurmontabilă. Dacă o depăşec, ei devin paraziţi.

Micorizele ectoendotrofe

Sunt prezente numai la speciile de arbori (brad, pin, molid) care în mod obişnuit formează ectomicorize. Micorizele ectoendotrofe au particularităţile anatomice ale ambelor tipuri majore de micorize. Mantaua fungică nu este foarte bine dezvoltată, dar prezintă concomitent reţeaua Hartig în cortex şi hife pătrunse intracelular. Fungii sunt probabil *fungi imperfecţi*. Reţeaua Hartig pătrunde printre pereţii celulelor epidermice în interiorul celulei gazdă, prin intermediul unor *haustori*.

Rolul micorizelor biologia plantelor

Micorizele conferă plantelor numeroase avantaje, în special legate de nutriţie şi dezvoltare. Micorizele funcţionează ca adevărate organe absorbtive radiculare, asociate cu fungii. Reţeaua Hartig creează o suprafaţă mare de contact cu celulele vegetale şi de aceea absorbţia nutrienţilor este mult mai intensă decât cea realizată prin porii radiculari.

Rădăcinile infectate cu fungi de micorize sunt de 2-3 ori mai lungi decât cele neinfectate, sunt mai grele şi mai ramificate. Formarea perilor radiculari este supresată, iar funcţia lor este preluată de hifele fungice.

Fungii de micorize au un rol foarte activ în preluarea nutrienţilor: P, N, Ca, Na. Fungii secretă metaboliţi care măresc solubilitatea ionilor minerali legaţi în sol, astfel încât ionii anorganici sunt preluaţi şi translocaţi direct în rădăcini, realizând un circuit închis al nutrienţilor (Atlas şi Bartha, 1987).

Mantaua fungică a ectomicorizelor acumulează Mg, Fe, Ca, K şi Si şi are rolul unui principal organ de acumulare, înainte de transferul lor în rădăcină.

Speciile de arbori beneficiază mai mult de prezenţa micorizelor, comparativ cu cerealele şi gramineele furajere, pentru că au puţine rădăcini şi peri absorbanţi.

Hifele fungice larg răspândite în sol traversează zonele deficitare în nutrienţi sau cu nutrienţi inaccesibili din apropierea rădăcinilor pentru a se ramifica şi exploata zone noi situate la distanţă, inaccesibile rădăcinilor ca atare.

Ramificarea şi creşterea continuă a hifelor şi conexiunile lor cu solul permit exploatarea extensivă la distanţă a acestuia.

Fungii produc substanţe de tip auxinic, care menţin echilibrul simbiotic cu celulele radiculare: de exemplu, acidul β-indol-acetic, utilizând triptofanul, sau o serie de citokine care împiedică maturarea şi suberizarea rădăcinilor infectate, prelungind perioada fiziologică activă.

Fungii produc auxine care măresc concentraţia glucidelor în rădăcinile plantelor, stimulând circulaţia mai intensă şi mai rapidă a fotosintatului, decât în rădăcinile lipsite de micorize.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fungii au rol protector, formând o barieră fizică ce împiedică accesul patogenilor. Mantaua fungică acoperă părţile cele mai fragile ale solului. În absenţa mantalei fungice, datorită peretelui celular foarte fin, rădăcinile tinere sunt invadate şi colonizate chiar de patogeni puţin virulenţi, iar planta se apără prin sinteza substanţelor antifungice (taninul). Dar impregnarea celulelor vegetale cu tanin afectează funcţia absorbtivă a rădăcinii şi determină creşterea deficitară a plantei.

Fungii de micorize produc acizi organici volatili cu efect fungistatic, menţinând un echilibru între fungii simbiotici şi cei patogeni din sol.

Micorizele pot compensa într-o măsură importantă distrugerile sistemului radicular.

Arborii individuali, aparţinând unor specii diferite pot fi legaţi între ei prin una sau mai multe specii fungice. Într-o comunitate vegetală naturală, cele mai multe plante sunt infectate de fungi din micorize. În consecinţă, este posibil ca toate plantele cu micorize veziculo-arbusculare să fie legate între ele de micelii ale unor specii de *Endogonaceae*. Asemănator, plantele cu ectomicorize pot fi legate de grupul de fungi. În acest cadru, compuşii cu carbon eliberaţi de arborii dominanţi, pot compensa necesităţile de nutrienţi ale plantelor care cresc la umbra lor. În felul acesta, competiţia dintre specii depinde de relaţia lor cu fungii.

Hifele favorizează formarea agregatelor de sol, având rol important în dezvoltarea structurii solului.

Coniferele lipsite de micorize ramân mici sau nu se dezvoltă de loc. Încetarea creşterii poate fi prevenită numai prin adăugarea fungilor de micorize, adică a solului de pădure.

Semnificaţia biologică a micorizelor este controversată. Pentru mulţi cercetători, micorizele sunt simbioze mutualiste echilibrate, avantajoase pentru ambii parteneri. În unele cazuri, asocierea are un caracter obligatoriu, iar alteori, plantele supravieţuiesc şi în absenţa partenerului simbiotic. În faza în care celulele fiziologic active ale celor doi parteneri sunt în contact intim, şi numai atunci, are loc un schimb bidirecţional de substanţe (Smith, 1980). După sfârşitul acestei faze, fie fungii, fie celulele gazdei, fie ambele degenerează.

Parazitismul

Parazitismul corespunde relaţiei în care un organism se hrăneşte cu celulele, ţesuturile sau cu lichidele altui organism, care poate suferi prejudicii mai mult sau mai puţin severe.

Relaţia parazit-gazdă este diferită şi variază de la ectoparazitism la parazitism intracelular obligat sau chiar la parazitism absolut.

În unele cazuri, interacţiunea are grad înalt de specificitate: virusul polio sau *M. leprae*, care în condiţii naturale infectează numai omul. Alteori, paraziţii au spectru larg de gazde.

Parazitismul intracelular

Moulder (1979) consideră că sistemul parazit intracelular-celula gazdă prezintă particularităţi proprii mediilor extreme.

Parazitul intră în competiţie cu gazda pentru intermediari de biosinteză, pe care îi dobândeşte uneori cu mare dificultate. Cel mai adesea, relaţiile parazit-celulă evoluează spre o stare de echilibru datorită tendinţei de multiplicare a parazitului, în aşa fel încât să nu depăşească limitele tolerate de gazdă. În general, relaţiile dintre parazit şi celula gazdă evoluează spre o stare de toleranţă, caracterizată printr-o infecţie prelungită, cu leziuni minime.

Tipuri de parazitism intracelular

Parazitismul facultativ intracelular este tipic pentru microorganismele cu exigenţe nutritive relativ moderate, care le conferă posibilitatea să se dezvolte pe medii inerte. De exemplu, *M. tuberculosis* se dezvoltă pe medii organice complexe, dar şi pe medii sintetice suplimentate cu aminoacizi, biotina, NH_4^+, glicerol.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Parazitismul obligat intracelular este caracteristic microorganismelor care au pierdut capacitatea de a exista extracelular.

Pătrunderea microorganismelor parazite în celulele gazdă are cel mai adesea un grad mare de specificitate. Înglobarea parazitului este precedată de legarea prealabilă de celula gazdă prin fenomene de recunoaştere bilaterală, pe baza interacţiunii unor structuri complementare. S-au descris două mecanisme principale de pătrundere a paraziţilor în celula gazdă:

- *endocitoza* corespunde situaţiei în care parazitul distruge continuitatea structurală a învelişurilor celulei gazdă şi intră înconjurat de o membrană derivată din cea a gazdei. Mecanismul este tipic pentru interacţiunea dintre *Plasmodium* şi hematiile vertebratelor.

- *diacitoza* (*dia*, grec = prin, de partea cealaltă) corespunde situaţiei în care parazitul perforează învelişurile externe ale celulelor gazdă, producând o discontinuitate prin care intră fără a fi inclus într-o membrană. Mecanismul este tipic pentru *Bdellovibrio*, care intră prin peretele perforat al bacteriei gazdă, propulsat fiind de mişcările flagelului. Ulterior, peretele celular este reparat prin formarea unei cicatrice, iar membrana citoplasmatică a bacteriei gazdă se depărtează de peretele celular. Astfel, *Bdellovibrio* nu este un parazit intracelular tipic, deoarece ramâne în compartimentul intramural şi nu în citoplasmă.

Pentru supravieţuirea în celulele gazdă, paraziţii au elaborat mai multe strategii:

- infectarea unei celule gazdă lipsită de lizosomi, ca de exemplu, eritrocitul matur, parazitat de *Bartonella* sau de protozoarul *Plasmodium* şi de hemosporidii;

- evadarea din fagosom curând după pătrunderea în celulă, descrisă iniţial la *Rickettsia mooseri*;

- împiedicarea fuziunii fagolizosomale este un mecanism mai comun întâlnit la *M. tuberculosis*, *Chlamydia, Legionella pneumophila, T. gondii*;

- rezistenţa la acţiunea enzimelor lizosomale, întâlnită la *C. burnetii*.

Parazitismul intracelular este rezultatul unei adaptări subtile şi complexe la mediul celulei gazdă, asociată cu pierderea capacităţii de a trăi extracelular.

La baza acestui proces ar sta o serie de procese de adaptare negativă, adică pierderea unor caractere neesenţiale pentru viaţa intracelulară. Adaptarea la viaţa parazitară este, se pare, asociată cu reducerea genomului, prin pierderea genelor neesenţiale. Unii paraziţi intracelulari au genomuri mici (*N. gonorrhoeae* are circa 1000 de gene, *Chlamydia* - circa 500 de gene) spre deosebire de bacteriile libere (*B. subtilis* – 5 - 6000 de gene, sau *E. coli* – 3 - 4000 de gene.

Prădarea

Este o interrelaţie în care un organism mai viguros - prădătorul - atacă un alt organism, provocându-i moartea, rapidă în cazul prăzii unicelulare sau distrugerea parţială ori totală în cazul celei multicelulare, urmată de utilizarea constituienţilor lor ca material nutritiv.

Brock (1976) pledează pentru un sens restrictiv, limitând prădarea la microorganismele fagotrofe, lipsite de un perete celular rigid, capabile să înglobeze şi să digere microorganismele cu dimensiuni mai mici. Relaţia este tipică pentru microorganismele bacteriovore, în timp ce microorganismele cu perete rigid sunt excluse de la acest tip de relaţie.

Cei mai mulţi autori pledează pentru un cadru mai larg, considerând că prădătorii pot fi întâlniţi şi printre eubacterii, mixobacterii, fungi, dinoflagelate, alge marine şi de apă dulce.

Un sistem bine cunoscut este cel reprezentat *de Didinium* (prădător) - *Paramecium* (prada), care la rândul său este prădător pentru bacterii.

Procariote prădătoare

La procariote, prădarea se poate realiza pe două căi majore.

Prădarea extracelulară se realizează prin activităţi enzimatice exercitate din afara celulei-pradă. Dintre numeroasele enzime extracelulare produse de bacterii, puţine pot ataca, dizolva şi digera celulele bacteriene vii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prădarea extracelulară este de două tipuri, corespunzând prădătorilor periplasmatici (*Bdellovibrio*) şi celor citoplasmatici (*Daptobacter*).

Bacteriile din g. *Bdellovibrio* (*bdellos* = lipitoare, parazit, exploatator) sunt parazite endocelulare, prădătoare şi bacteriolitice. Celula de *Bdellovibrio* atacă atât bacteriile sensibile cât şi insensibile, dar se leagă stabil numai de primele. Atacul este realizat prin coliziuni violente, urmate de legarea de suprafaţa celulei gazdă, prin extremitatea neflagelată. Parazitul pătrunde în celula gazdă printr-un mecanism necunoscut, cel mai probabil prin perforarea favorizată de prezenţa unor spicule la polul de legare. Parazitul pătrunde în spaţiul dintre perete şi membrana citoplasmatică. Apoi, peretele celular este reparat şi închis.

Multiplicarea parazitului are loc într-un spaţiu închis extracitoplasmatic, respectiv intramural sau periplasmatic. Celula invadată se modifică morfologic şi devine un corp globulos sau bdelloplast, dar şi fiziologic (blocarea sintezei ADN, ARN şi a proteinelor, modificarea activităţii respiratorii, modificări nucleare etc.). Celulele de *Bdellovibrio* cresc filamentos spiralate, devenind de câteva ori mai lungi decât celula infectată. Multiplicarea parazitului se realizează prin fragmentarea filamentului în celule mobile, identice cu cele infectante, care pot umple celula gazdă.

Eliberarea celulelor progene în mediu se face brusc, odată cu distrugerea învelişurilor celulei gazdă. Singura sursă de nutrienţi a parazitului este sferoplastul celulei parazitate.

Bacteriile din g. *Daptobacter* (*dapto* = a roade, a devora, a distruge) se fixează perpendicular pe celulele pradă de *Chromatium vinosum*, *C. minutissimum*, *Lamprocystis* şi *Thiocapsa roseopersicina* distruge peretele celular şi membrana citoplasmatică şi pătrunde în celulă. Pe mediile de cultură, în curs de câteva zile, rezultatul lizei constă în apariţia unor plaje de liză cu diametrul de 0,5 cm colorate roşu-pal.

Semnificaţie biologică. Unele bacterii prădătoare evidenţiază relaţii nutriţionale puţin cunoscute la procariote. Astfel, *Vampirovibrio chlorellavorus*, *Vampirococcus* şi *Daptobacter* care pradă alga *Chlorella* şi respectiv bacteriile fotoorganotrofe sunt consumatori primari, echivalenţi organismelor fitofage, deoarece se hrănesc cu organisme fotoautotrofe.

Se consideră că relaţia de prădătorism a apărut iniţial la procariote, în ecosistemul anoxic în era paleozoică (Guerrero şi colab., 1986, Margulis şi colab., 1986), când microorganismele erau singurele organisme de pe Pământ. Se poate presupune că în perioada în care bacteriile fototrofe erau singurii producători primari şi bacteriile heterotrofe singurii consumatori, între procariote au existat relaţii ecologice analoge cu cele existente între organismele eucariote în prezent.

Pătrunderea unor bacterii prădătoare (*Bdellovibrio*) în spaţiul periplasmatic sau citoplasma (*Daptobacter*) reprezintă argumente în favoarea teoriei endosimbiotice privind originea bacteriană a organitelor celulei eucariote.

B. MICROBIOTA NORMALĂ A MAMIFERELOR

Deşi organismele animale sunt sterile în cursul vieţii intrauterine, imediat după naştere sunt colonizate progresiv de un număr mare de microorganisme, care se găsesc pe suprafaţa corpului şi a diferitelor mucoase, în special pe traiectul digestiv. Numărul microorganismelor la omul adult este apreciat la 10^{14} celule, cu un grad de mărime peste numărul total al celulelor organismului uman (10^{13}) (Dobzhansky, 1974), cea mai mare parte fiind localizate în sistemul digestiv.

Microorganismele asociate organismului animal şi uman aparţin la două categorii majore:

1) Microbiota *normală* sau *asociată* este reprezentată de microorganisme indigene sau autohtone. Asocierea lor cu microorganismele a fost stabilită în cursul evoluţiei comune şi sunt reprezentate de bacterii, microfungi şi protozoare. Deşi de la copiii sănătoşi au fost izolate şi cultivate mai multe virusuri, Reed şi colab. (1974) consideră că în mod normal nu există virusuri asociate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) Microorganismele *străine* sau *alohtone* provin din mediul extern (aer, sol sau de la alte animale). Unele pot fi patogene. Frecvent sunt numai în tranzit, fără să contribuie semnificativ la activitatea microbiotei normale, la ale cărei condiţii nu se pot adapta.

O situaţie particulară o prezintă microbiota gastrointestinală. Un microorganism poate fi autohton pentru un anumit segment şi alohton pentru altul pe care îl tranzitează după ce s-a desprins de habitatul sau natural.

Colonizarea şi succesiunea populaţiilor de microorganisme asociate organismului uman

Colonizarea microbiană a tuturor suprafeţelor externe şi a unora interne ale organismului începe la naştere. Procesul este, de regulă benefic atât pentru microorganisme cât şi pentru gazdă, în sensul că fiecare furnizează ceva esenţial celuilalt şi primeşte în schimb ceva esenţial.

Fătul este steril *in utero*, dar se infectează în cursul trecerii prin vagin şi genitalele externe materne şi de la orice sursă din mediu, la care este expus.

În cursul procesului de colonizare, multe microorganisme contaminante mor şi dispar, deoarece nu se pot adapta. Totdeauna există unele specii-pionier care se stabilizează, aderă la diferite substraturi sau se divid cu o rată superioară decât cea a eliminarii. La sugarul hrănit la sân, primele bacterii care apar în sistemul digestiv aparţin g. *Lactobacillus*, urmat după 1-2 zile de *Bifidobacterium*, care devine predominant numeric. Ulterior se instalează alte specii facultativ anaerobe (*E. coli, S. faecalis*).

Modificarea majoră a microbiotei la toate animalele studiate este asociată cu tranziţia la alimente solide, când apar bacterii strict anaerobe (*Bacteroides*), în special în intestinul gros, iar numărul celor facultativ anaerobe scade progresiv.

Mecanismele colonizării sunt puţin cunoscute. Colonizarea trebuie să învingă sistemele de eliminare mucociliare (care depărtează bacteriile nelegate de epitelii), fluxul unidirecţional al lichidelor pe suprafaţa epiteliilor şi activitatea peristaltică (a tubului digestiv), turnover-ul celulelor epiteliale senescente, sistemele imunitare locale, variaţiile pH şi ale potenţialului redox, agenţii antimicrobieni nespecifici ai gazdei, competiţia cu alte microorganisme etc.

S-a semnalat existenţa unei anumite asemănări antigenice între suprafaţa celulei microbiene şi mucusul sau mucoasa intestinală, în care ocupă un habitat.

Aderenţa are un caracter de specificitate, în sensul că epiteliile situate în diferite localizări anatomice leagă specii bacteriene diferite.

Aderenţa bacteriană este, de regulă, funcţia adezinelor bacteriene, care se leagă de receptorii complementari de pe suprafaţa celulelor epiteliale ale gazdei, care se leagă de receptorii glicoproteici sau glicolipidici de pe suprafaţa epiteliilor.

Aderenţa trebuie să învingă mecanismele de apărare ale gazdei:

- producerea de Ig A din secreţii (sIgA);
- sinteza de lizozim,
- sinteza de analogi ai receptorilor specifici, care se combină cu suprafeţele de legare bacteriană, neutralizându-le capacitatea de aderenţă;
- efectul antibacterian al bilei neconjugate, care explică numărul mic al bacteriilor din intestinul subţire;
- producerea de către gazdă, a unor proteine care leagă Fe, creind un deficit de Fe pentru bacterii
- existenţa unor situsuri anatomice favorabile pentru unele microorganisme (pH, potenţial redox).

Microbiota normală a tractului respirator

La nivelul căilor respiratorii superioare (nări şi nazofaringe), numărul microorganismelor este mic, fiind reprezentate de *S. aureus* şi specii coagulază-negative (*Corynebacterium, Peptostreptococcus* şi *Fusobacterium*). Tranzitoriu, în nări, prezenţa altor microorganisme este comună.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În nazofaringe, populaţia de microorganisme este mai complexă: predomină speciile de *Streptococcus* şi *Neisseria* (streptococii α-hemolitici şi 12 specii de *Neisseria*). Colonizarea cu *N. meningitidis* atinge valori mari (până la 95%) la adulţii tineri din aglomerările umane.

În căile respiratorii medii (orofaringe şi tonsile) predomină cocii Gram pozitivi şi Gram negativi. Cei anaerobi depăşesc pe cei aerobi în proporţie de 100/1.

Căile respiratorii inferioare (laringe, trahee, bronhii şi plămâni) sunt sterile.

Microbiota tractului digestiv

În salivă şi pe suprafaţa limbii se găsesc streptococi din grupul viridans *(Str. salivarius)*. Suprafaţa dinţilor este colonizată cu *S. sanguinis, S. mutans*, iar mucoasa orală, cu *S. vestibularis* şi *S. sanguis*. Alţi streptococi din orofaringe sunt cei β-hemolitici. *S. pyogenes* produce faringita streptococică, dar poate coloniza tranzitoriu persoanele sănătoase.

Alţi coci Gram pozitivi din orofaringe: *Stomatococcus mucilaginosus, Gemella* sp. şi *Peptostreptococcus*. Dintre cocii Gram negativi anaerobi, cei mai frecvenţi sunt speciile de *Veillonella*.

Bacilii Gram pozitivi din microbiota orofaringelui sunt speciile de *Actinomyces, Actinobacillus, Corynebacterium, Lactobacillus, Propionibacterium. Actinobacillus actinomycetemcomitans* este cauza periodontitei juvenile.

Bacilii Gram negativi anaerobi din orofaringe: *Fusobacterium, Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Selenomonas, Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae*.

Candida albicans (grupul fungilor) se găseşte aproape la toţi indivizii.

Protozoarele din orofaringe sunt reprezentate de *Entamoeba gingivalis* şi *Trichomonas tenax*, dar nu produc boli.

Habitatele microbiotei gastrointestinale

Ecosistemul gastrointestinal este complex, deschis, integrat şi format din mai multe habitate pentru microorganisme. Fiecare habitat este colonizat de mai multe specii de microorganisme autohtone. Acestea pot avea trei localizări:

1) Lumenul are calitatea de habitat în măsura în care microorganismele pot coloniza materialele prezente în el. Habitatul adevărat este reprezentat de suprafaţa particulelor de materiale solide, cum ar fi cele ale constituienţilor alimentari.

2) Suprafaţa epitelială a diferitelor regiuni ale tubului digestiv.

3) Criptele mucoaselor, prezente mai ales în intestinul subţire superior, cecum şi colonul anumitor animale.

Microbiota gastrică. Stomacul este un compartiment ostil dezvoltării microorganismelor şi de aceea este considerat steril, dar poate conţine microorganisme ingerate odată cu alimentele sau cu apa. Acest fenomen este foarte accentuat la animalele coprofage (rozătoare, porc, etc) care ingeră cantităţi imense de microorganisme alohtone provenite din fecale.

Odată ajunse în stomac, marea majoritate a microorganismelor sunt distruse de aciditatea secreţiei gastrice. Microbiota este săracă, asociată cu suprafaţa epiteliului, fiind protejată de secreţia de mucus şi de bicarbonat. Bacteriile prezente sunt acidotolerante: *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* sp., *H. pylori*. Ultimul pare a fi implicat în producerea gastritei, a ulcerului gastric duodenal şi este asociat cu malignitatea gastrică.

Microbiota intestinului subţire. Acest segment oferă trei regiuni majore, cu condiţii de mediu distincte: duoden, jejun şi ileon. În condiţii normale, microbiota este limitată (10^5 celule/ml) şi predomină anaerobii: *Lactobacillus, Streptococcus, Candida albicans, Bifidobacterium, Bacterroides, Clostridium*, unele derivate în mod cert din cavitatea bucofaringiană.

În ileon pot fi găsite bacterii provenite din colon. Dacă se produce obstrucţia tractului intestinal are loc staza, iar microbiota se aseamănă cu cea din colon (*Bifidobacterium, Bacteroides, Clostridium, E.coli, Enterococcus*) şi duce la malabsorbţie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Factorii limitanți ai multiplicării bacteriilor în intestinul subțire sunt: aciditatea gastrică, peristaltismul intestinal care asigură tranzitul relativ rapid spre intestinul gros și existența unor substanțe care inhibă creșterea microorganismelor.

Microbiota intestinului gros. La om și la cele mai multe mamifere, microbiota acestui segment este alcătuită din câteva sute de specii bacteriene intolerante la O_2, dintre care puține au fost cultivate *in vitro* și identificate. Microorganismele alohtone devin semnificative dacă densitatea lor depășește 10^6 celule/g de conținut intestinal. Ele provin din alimente sau din etajele superioare ale tractului digestiv.

La om, numărul bacteriilor strict anaerobe este de peste 10^{11} celule/g, în care predomină *Bifidobacterium* sp., grupul *Bacteroides fragilis, Enterococcus*, în timp ce coliformii reprezintă numai 0.1-1%. În colonul normal nu se găsesc protozoare. Multe bacterii sunt legate de celulele epiteliale ale mucoasei sau chiar inclavate între acestea.

Microbiota colonului poate determina complicații severe, când integritatea barierei intestinale este compromisă (apendicite etc.). Bacteriile coliforme, originare în colon produc infecții genito-urinare. NH_3 produs de bacterii prin dezaminarea aminoacizilor nedigerați, este toxic. Efectul se manifestă atât asupra mucoasei colonului, generând leziuni ale acesteia, cât și asupra ficatului. Microbiota ar putea fi implicată, direct sau indirect în geneza cancerului de colon. Incidența bolilor colonului, în general, este mult redusă la populațiile care consumă multe fibre vegetale, comparativ cu cele care au un regim bogat în grăsimi și proteine.

Relația dintre structura sistemului digestiv și microbiota normală

În funcție de structura sistemului digestiv au fost descrise trei tipuri de habitate; care oferă microorganismelor condiții diferite de mediu.

1) Tipul "tub drept" - caracteristic mamiferelor carnivore, omnivore și insectivore - corespunde unei hrane reprezentată de proteine, glucide și lipide, digerabile atât de enzimele digestive, cât și de microorganisme. Caracteristica esențială este existența stomacului foarte acid, care limitează multiplicarea microorganismelor ce se dezvoltă progresiv, pe masură ce secrețiile alcaline restabilesc un pH favorabil.

2) Tipul "multicameral" al rumegătoarelor, caracterizat prin prezența unei camere de fermentație, deviată de la linia de tranzit al alimentelor precedând stomacul propriu-zis - *rumenul* caracteristic pentru *Bovidae* și *Ovinae* sau situată "în linie", sub forma unei regiuni parțial separată de restul tubului digestiv (la marsupiale, maimuțe, ierbivore).

Caracteristica fundamentală este reprezentată de dezvoltarea unei microbiote imense, strict anaerobe, care fermentează hrana cu producere de acizi grași volatili absorbiți și oxidați de gazdă, biomasa microbiană și gaze (CO_2, CH_4 sau H_2). Interacțiunea majoră între microorganisme și gazdă este de *cooperare*.

3) Tipul "cecal" (la cal, rozătoare, iepure, elefant etc.) corespunde animalelor cu stomac acid și un cecum bine dezvoltat. Materialele nedigerabile de către enzimele digestive ale gazdei sunt fermentate într-un cecum lărgit și în regiunea superioară a colonului. Celulele microbiene nu pot fi digerate de către gazdă, deoarece se formează distal față de compartimentul enzimatic care ar putea asigura utilizarea lor. Tipul "cecal" este mai puțin eficient decât cel ruminal. Handicapul este compensat, cel puțin la unele specii, prin coprofagie, care asigură ingestia de nutrienți sub forma celulelor microbiene și de acizi organici rezultați din fermentație.

Rolul fiziologic al microbiotei gastrointestinale

Microorganismele gastrointestinale au funcții nutriționale cu importanță diferită la rumegătoare și la mamiferele monogastrice. Studiile au evidențiat că la rumegătoare, rolul microorganismelor indigene este esențial, iar la animalele monogastrice și la om, rolul lor este mai curând accesoriu.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fermentația în intestinul gros. La animalele adulte, în funcție de cantitatea de alimente ingerate și de natura lor, materialele ce nu pot fi degradate de enzimele acestora în stomac și în intestin, sunt reținute temporar în intestinul gros. Ele includ constituienți fibroși provenind din materialele vegetale (celuloză, hemiceluloze), amidon, pectine, proteine și acizi nucleici etc. Lor li se adaugă macromolecule endogene aparținând unor clase diferite de polizaharide ca, de exemplu, mucus gastrointestinal, imunoglobuline, constituienți ai celulelor descuamate etc., precum și unele glucide cu moleculă mică, cum sunt stahioza din fasole, rafinoza din semințele de bumbac etc. La bolnavii cu deficiență genetică de hidroliză a lactozei, aceasta devine disponibilă pentru fermentație în intestinul gros. Nu se știe în ce măsură, în intestinul gros, ajung componente ale cărnii ingerate. Hidroliza substanțelor complexe și transportul produșilor rezultați în celulele bacteriene, sunt efectuate de sisteme enzimatice inductibile. Sinteza enzimelor hidrolitice este blocată prin represie sau activitatea lor este inhibată prin feed-back. Fermentația este asigurată de o comunitate complexă de bacterii care atacă hexozele cu producere de acizi grași volatili (acetic, propionic, n-butiric, izobutiric, valeric, izovaleric și caproic), metan, CO_2. O parte din acizii grași rezultați în fermentație sunt absorbiți prin peretele colonului, trec în sânge și sunt metabolizați de organismul gazdei (Savage, 1986).

Unele microorganisme intestinale sintetizează în exces față de nevoile proprii, o serie de vitamine pe care le eliberează în lumenul intestinal (acid folic, piridoxina, biotina, acid pantotenic, riboflavina, vitaminele K și B_{12}. Nu se știe în ce masură, ele sunt preluate efectiv de organismul uman, deoarece sunt produse, în special, de organisme din cecum și colon. Uneori, efectul este invers, de deficit de vitamina B_{12} pentru om, în urma consumării ei de către microorganismele intestinale. În plus, bacteriile se lizează și eliberează în sistemul digestiv al mamiferelor, toate componentele celulare.

Unul din produșii azotați, care se găsește în intestinul gros este ureea. Ea ajunge în intestin prin difuzia din sângele capilarelor. Bacteriile o hidrolizează la CO_2 și NH_3, ultimul fiind folosit pentru biosinteze.

În cursul fermentației se produc cantități importante de gaze (CO_2, H_2, CH_4, apreciate la 200 – 2000 ml/zi (Mallison, 1987). La circa 33% din indivizii umani, produsul major este metanul. O mare parte din H_2 și CH_4 sunt absorbite în sânge și sunt eliminate la nivel pulmonar. Producerea simultană de CH_4 și H_2 este rară, deoarece H_2 este folosit pentru reducerea CO_2 la metan.

Microbiota normală grăbește tranzitul digestiv, care este mult mai lent la animalele germ-free. Mecanismul acestei acțiuni este necunoscut. Probabil este rezultatul acțiunii sinergice a unor constituienți chimici sau fizici din alimentatie și a produșilor finali de metabolism bacterian, asupra proceselor de neurotransmitere la mușchii netezi.

Sistemul ecologic microbiotă/intestin poate fi perturbat prin: a) administrarea unor substanțe antibiotice care distrug microorganismele sensibile creind disbioze; b) prin infecții sau alte boli ale sistemului.

Microbiota normală influențează rata de turnover a eritrocitelor și a activității lor enzimatice. Rata înlocuirii acestor celule este de două ori mai mare la animalele convenționale de laborator decât la cele axenice.

Microbiota normală are funcția de barieră antiinfecțioasă. Microorganismele autohtone exercită o funcție de barieră care protejează organismele animale de implantarea unor organisme alohtone, ce pătrund cu alimentele sau cu apa. Această funcție este pregnant evidențiată de comportamentul diferit al animalelor axenice (germ-free) față de cel al animalelor convenționale. Șoarecii axenici pot fi infectați per os, cu mare ușurință de *Sh. flexneri* sau cu *S. enteridis* (10 celule bacteriene). Ele se multiplică, se stabilizează și se pastrează la densitatea de 1-10 miliarde celule/g de conținut intestinal. Animalele holoxenice (convenționale) elimină microorganismele infectante, cu aceiași rată cu care îndepărtează un marker de control inert (sporii de *B. subtilis*, termofili, incapabili să germineze). Doza infectantă este de 10^6 celule de *S. enteridis*. Fenomenul a fost descris sub denumirea de "efect de barieră" (Ducluzeau, 1970).

Populațiile de microorganisme din sistemul digestiv și gazda lor formează un sistem ecologic al cărui echilibru este indispensabil pentru sănătatea individului. În acest sistem se realizează o serie de interacțiuni complexe, sinergice și antagonice, pe de o parte între diferitele

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

populații de microorganisme, iar pe de altă parte, între ele și gazda lor, care asigură echilibrul sistemului. În stările de *disbioză*, care apar la om consecutiv terapiei cu antibiotice cu spectru larg, echilibrul este alterat.

Unele observații de laborator demonstrează existența unor efecte negative ale microbiotei normale. Unele microorganisme indigene pot favoriza pătrunderea unui microorganism patogen în organismul gazdă. *Entamoeba histolytica* este totdeauna comensală în intestinul gros, la animalele de laborator. Stabilirea ei în organismele-gazdă depinde de microbiota rezidentă. De aceea, animalele axenice sunt foarte rezistente la infecție. Rarele episoade de patogenitate la animalele convenționale sunt determinate, după Mackwiak (1982), de intervenția factorilor de virulență proveniți de la bacteriile intestinale indigene.

Relația dintre microbiota normală și cancer a devenit evidentă după ce s-a demonstrat că microorganismele pot hidroliza substanțe inofensive cu producere de compuși cancerigeni. Prin reducerea nitratului și aminelor (utilizați ca prezervanți) de către microorganisme pot rezulta *nitrozamine* (Walker,1973). Unele microorganisme intestinale pot sintetiza nitrozamine *in vivo*, la pH neutru.

Translocația bacteriilor din intestin

Translocația este fenomenul de trecere a bacteriilor din lumenul intestinal în ganglionii mezenterici, urmat adesea de localizare în diferitele situsuri extraintestinale. El are loc cu precădere la persoanele imunosupresate, expuse unor mari traumatisme sau intervenții chirurgicale și determină complicații infecțioase grave, adesea sistemice.

Translocația se realizează, de obicei, practic, exclusiv cu bacterii aerobe și facultative aerobe: *E. coli, K. pneumoniae, Proteus mirabilis, Enterococcus sp., Lactobacillus sp., Candida albicans* și probabil *Staphylococcus* sp., dar și cu bacterii patogene: *Salmonella* sp., și *L. monocytogenes*.

Prin contrast, în mod normal, bacteriile strict anaerobe nu sunt expuse translocației din intestin și produc arareori complicații infecțioase. Ele pot fi translocate, numai în cazurile în care integritatea mucoasei intestinale este grav compromisă (după iradiere letală, arsuri grave, ischemie mezenterică acută, administrare orală de acid ricinoleic etc.).

Bacteriile strict și facultativ aerobe sunt translocate prin epiteliul intestinal histologic intact. Celulele epiteliului intestinal - în special cele ileale - ar reprezenta poarta principală de intrare, iar ganglionii limfatici mezenterici ar fi cei mai sensibili. Wells (1990) consideră că eritrocitele fagocitează bacteriile și le eliberează la polul bazal, în lamina proprie. De aici pot lua calea limfatică, spre ganglionii limfatici mezenterici, sau ajung la ficat pe cale vasculară.

Bacteriile strict anaerobe nu pot transloca, deoarece se leagă greu de enterocite, neavând situsuri-receptor pentru celulele epiteliale intestinale. Ele trec numai prin epiteliul lezat. Raportul dintre celulele anaerobe și cele strict sau facultativ aerobe în intestin oscilează între 100 : 1 și 1000 : 1, ceea ce denotă că translocația nu este dependentă de densitate.

Microbiota normală a tractului urogenital

Tractul urogenital este steril, cu excepția uretrei și a vaginului. Microorganismele pot să migreze ascendent prin uretră, până în vezica urinară, dar în mod normal sunt rapid eliminate de anticorpii din secreții, de acțiunea microbicidă a celulelor epiteliale ce căptușesc vezica, precum și de fluxul urinar descendent.

Uretra feminină este colonizată de un număr mare de lactobacili, streptococi și stafilococi coagulază-negativi. Bacteriile de origine fecală (*E. coli, Enterococcus faecalis, Proteus mirabilis, C. albicans*) pot coloniza tranzitoriu uretra, dar când ajung în vezica urinară, proliferează și produc infecții ale tractului urinar.

Microbiota vaginală este mai abundentă și mai diversificată. Predomină lactobacilii, deoarece se multiplică în mediu acid. Alți anaerobi vaginali: *Bifidobacterium, Peptostreptococcus, Porphyromonas*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Bacterii aerobe: *Staphylococcus, Streptococcus, Corynebacterium, Mycoplasma, Candida*. În mod obişnuit, *Trichomonas* este prezent în număr mic, dar poate prolifera şi produce vaginita.

Microbiota normală a pielii

Pielea nu oferă condiţii favorabile dezvoltării microorganismelor, deoarece este expusă unor variaţii extreme de temperatură, umiditate, dezinfectanţi chimici (săpun, şampon). De aceea, populaţia microorganismelor este mai mică şi mai simplă comparativ cu alte situsuri corporale. Totuşi, numeroase bacterii îşi stabilesc rezidenţa permanentă pe suprafaţa pielii. În plus, se produce şi o colonizare tranzitorie cu o diversitate de microrganisme din mediul extern şi cu microorganisme endogene.

Suprafaţa pielii este foarte heterogenă. Sunt arii uscate şi fără păr (palme, tălpi), arii cu o mare densitate a glandelor sudoripare (regiuni axilare, inguinale, perianală), arii bogate în glande sebacee (fruntea, pliurile nazolabiale).

Microorganismele proliferează în mediu umed: zonele cu glande sudoripare şi suprafeţele ocluzate. Pielea feţei, aria perirectală sau perigenitală au o microbiotă mai complexă. Pe suprafaţa pielii, bacteriile anaerobe sunt de 10 -100 de ori mai numeroase decât cele aerobe. În raport cu levurile, predomină net bacteriile şi în special, cele Gram pozitive: *Staphylococcus, Micrococcus, Corynebacterium, Peptostrptococcus, Propionibacterium*.

Bacteriile Gram negative colonizează tranzitoriu suprafaţa pielii, deoarece peretele celular subţire nu protejează celula de acţiunea detergenţilor. *Acinetobacter* se găseşte în zonele umede: regiunea inguinală, axilară, pe tegumentul interdigital.

Microbiota din rumen

Hrana unei mari varietăţi de mamifere este formată într-o proporţie importantă din materiale vegetale, pe care nu le pot digera, datorită absenţei enzimelor necesare. Microorganismele din tubul digestiv asigură transformarea substanţelor polizaharidice complexe (celuloze, hemiceluloze, pectine, amidon etc.) la forme asimilabile.

La *ierbivorele nerumegătoare*, după digestia din stomac şi intestinul subţire, tesuturile vegetale sunt degradate într-un cecum lărgit şi în colon. Uneori, cecumul este atât de mare încât atinge lungimea corpului animalului. Digestia microbiană a materialului vegetal este relativ ineficientă, fiind de ordinul a 20 - 30%. Produşii de degradare sub acţiunea microorganismelor sunt absorbiţi prin mucoasa intestinală în sânge, iar microorganismele sunt eliminate, în cea mai mare parte, prin fecale.

Rumegătoarele (bovine, ovine, caprine etc.) prezintă un compartiment specializat, pregastric - *rumenul* - la nivelul căruia are loc digestia polizaharidelor vegetale, prin acţiunea bacteriilor şi protozoarelor. La rumegătoare, "stomacul" este compartimentat, fiind alcătuit din *rumen* (burduf), *reticulum* (ciur) şi *omassum* (foios), considerate ca expansiuni ale esofagului şi *abomassum* (chegul), singurul compartiment care conţine glande gastrice şi la nivelul căruia începe digestia propriu-zisă.

Rumenul este populat de o comunitate complexă de microorganisme autohtone, formată din bacterii specifice anaerobe, protozoare ciliate, un număr mic de protozoare flagelate, câţiva fungi aerobi. Se adaugă o serie de microorganisme anaerobe sau aerobe aflate în tranzit, cu activitate nesemnificativă.

Bacteriile din rumen pot fi libere, imobile, mobile sau aderente de celulele mucoasei ruminale prin intermediul fimbriilor, glicocalixului sau polizaharidelor extracelulare. Cele mai multe colonizează masa alimentară. Din cele câteva sute de specii bacteriene din rumen, numai 17-30 domină numeric şi au activitate biochimică funcţională: *Bacteroides amylogenes, B.amylophilus, B.ruminicola, B.succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens, Clostridium locheadii, Lachnospira fibrisolvens, Methanobacterium ruminantium, Ruminococcus albus, Succinogenes amylolitica* etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Protozoarele din rumen sunt *oligotriche* (*Diplodinium, Entodinium, Metadinium, Ophryoscolex*). Ele înglobează şi fermentează materialele particulate. Cele *holotriche* au pe lângă activitate celulozolitică, şi capacitatea de a utiliza glucidele solubile şi de a produce metaboliţi utilizabili de către gazdă. Numărul lor este evaluat la 10^5-10^6 celule/ml.

Ca grup, importanţa ecologică a protozoarelor derivă din capacitatea lor de a ataca celuloza, hemiceluloza, pectinele, amidonul, precum şi de asimilare rapidă a glucidelor solubile.

Protozoarele ciliate utilizează glucoza, fructoza, galactoza, zaharoza, rafinoza şi inulina şi produc acetat şi butirat când fermentaţia este lentă, respectiv lactat când fermentaţia este rapidă. O parte din azotul necesar, îl obţin din celulele bacteriene pe care le ingeră şi le digeră. Principala sursă de hrană a protozoarelor sunt bacteriile. Protozoarele utilizează aminoacizii eliberaţi prin proteoliza bacteriilor şi a alimentelor, dar şi de a sintetiza aminoacizi. Stochează polizaharide de rezervă, cu o lungime de 22 resturi de glucoză. Circa 75% din numărul protozoarelor sunt reţinute în rumen unde mor şi sunt lizate. Williams (1984) apreciază că 20% din proteinele microbiene disponibile pentru gazdă provin din protozoare.

Rolul microorganismelor din rumen

Microorganismele din rumen provin din surse exogene (aer, apă, furaje, contactul cu alte animale). Popularea rumenului are loc progresiv după naştere. La viţel, protozoarele apar în cea de a II-a lună după naştere, şi prezenţa lor este asociată cu creşterea capacităţii de digestie. Digestibilitatea atinge parametrii normali la vârsta de 12 luni.

La rumegătoare, hrana urmează un circuit special: după fragmentare, prin masticaţie şi amestec cu salivă, alimentele trec în rumen, unde microbiota iniţiază procesul de fermentatie. Ulterior, masa alimentară este transferată în reticulum, este separată în porţii mici - "ghemuri" - care sunt regurgitate în cavitatea bucală pentru re-masticaţie şi divizare în fragmente tot mai mici, mărind suprafaţa de atac pentru microorganisme. Acestea, prin actul deglutiţiei, trec direct în reticulum, în omassum, apoi în abomassum, duoden, intestin.

Digestia ruminală a materiilor vegetale este rezultatul unor procese complexe, care implică participarea a numeroase microorganisme şi enzime.

Microorgnismele fibrolitice degradează polizaharidele vegetale în diferite grade, în funcţie de structura lor chimică (celuloza 58-80%, amidonul 75%, proteinele 88%, lignina 0%) Din celuloză şi hemiceluloze, iniţial rezultă celobioza şi glucoza, care apoi suferă fermentaţia anaerobă, cu producere de oligozaharide solubile, utilizabile de către microorganismele ruminale.

La bovine, sub acţiunea enzimelor extracelulare, produşii finali ai fermentaţiei substanţelor complexe sunt o serie de acizi graşi volatili cu lanţ scurt, în principal acetat (40-80% din total), propionat, butirat şi cantităţi mici de acizi izobutiric, izovaleric, valeric, caproic şi heptanoic. Este eliberată o cantitate mare de gaze (60-80 l/zi la bovinele mature), care sunt eliminate prin eructaţie. Dintre acestea, 60-70% este CO_2, iar restul este CH_4.

Acizii graşi volatili sunt rapid absorbiţi în circulaţia sanguină şi utilizaţi astfel: acetatul este sursa majoră de energie; propionatul este singurul acid gras volatil care poate fi convertit la glucide prin procesul de gluconeogeneză.

O vacă de 500 kg poate sintetiza zilnic 1 kg de lactoză (corespunzător la 30 l de lapte), pornind de la acizii graşi volatili care trec prin peretele rumenului; butiratul este utilizat pentru sinteza acizilor graşi.

Proteinele din furaje, în rumen sunt hidrolizate de microorganisme, la peptide, aminoacizi şi NH_3. Cantităţi importante de NH_3 trec prin peretele ruminal în sânge şi sunt convertite în uree la nivelul ficatului. O parte din azotul care a urmat această cale revine în rumen fie direct din circuitul sanguin, fie pe calea salivei, sub formă de uree. O parte din uree este eliminată prin urină. Ureea reintrată în rumen odată cu saliva este convertită la NH_3 şi CO_2.

Simultan cu aceste reacţii degradative, la nivelul rumenului are loc o sinteză de proteine microbiene, de la peptide, aminoacizi şi NH_3, care amplifică mărimea biomasei de microorganisme. În acelaşi timp, există o trecere continuă de proteine alimentare nedigerate, de proteine microbiene şi azot

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

neproteic în abomassum şi intestin, unde sunt hidrolizate la aminoacizi, care sunt absorbiţi. În rumen, proteina alimentară cu valoare nutritivă redusă este convertită la proteina microbiană cu valoare mult mai ridicată.

Pornind de la premisa că producerea de CH_4 şi eliminarea lui prin eructaţie reprezintă o pierdere de 10% din energia disponibilă pentru rumegătoare s-a încercat utilizarea unor tehnici de diminuare a producerii de CH_4 şi de creştere simultană a eliberării de acizi graşi volatili, care asigură o utilizare mai economică a hranei. Adaugărea antibioticului ionofor *monesina* în alimentaţie, creşte randamentul formării de propionat şi scade producţia de CH_4 în rumen. Animalele utilizează mai eficient hrana, consumă mai puţin decât martorii, dar câştigă în greutate cu aceeaşi rată. Probabil, monensina selecţionează microorganismele care produc mai mult propionat şi mai puţin H_2. Scăderea concentraţiei de H_2 are drept consecinţa diminuarea producerii de CH_4. Bacteriile metanogene îşi obţin energia, prin oxidarea H_2 necesară reducerii CO_2 la CH_4.

Microorganismele probiotice

Conceptul de *"probiotic"* a fost formulat 1965 (Lilly şi Stillwell) pentru a descrie substanţele produse de un protozoar (*Tetrahymena pyriformis*) care favorizează creşterea altui protozoar (*Stylonychia* sp.). Parker (1974), sub denumirea de probiotic reuneşte orice supliment alimentar, care are efect asupra gazdei, prin modificarea microbiotei intestinale.

Fuller (1989) consideră ca probiotic, orice organism viu care, adăugat alimentelor are efect benefic asupra organismului gazdă prin ameliorarea echilibrului microorganismelor din sistemul digestiv.

Preparatele probiotice utilizează una sau mai multe tipuri de bacterii (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* sp.) şi se adaugă în hrana animalelor de crescătorie sau sub diferite forme (granule, pudră, pastă, capsule).

Caracteristicile unui bun probiotic însumează:

- lipsa de patogenitate şi toxicitate;
- capacitatea de a supravieţui în mediul intestinal;
- să exercite efecte benefice asupra organismului gazdă;
- să fie accesibil din punct de vedere economic;
- să fie stabil prin tehnica de conservare.

Modul de acţiune al probioticelor este relativ puţin cunoscut, dar s-au identificat câteva căi majore:

1) Efectul direct, antagonist prin producerea unor metaboliţi de tipul acizilor organici, H_2O_2 sau a unor subtanţe macromoleculare cu acţiune antimicrobiană; competiţia pentru nutrienţi; blocarea colonizării bacteriilor patogene prin competiţie pentru situsurile de aderenţă pe suprafaţa epiteliului intestinal;

2) Modificarea metabolismului microbiotei intestinale, prin creşterea activităţii unor enzime sau diminuarea altora;

3) Stimularea imunităţii prin creşterea activităţii macrofagelor şi a concentraţiei de sIgA.

Efectele produselor probiotice sunt: a) stimularea creşterii în greutate şi protecţia faţă de infecţiile intestinale; b) atenuarea fenomenelor de intoleranţă la lactoză prin deficienţa congenitală a β-galactozidazei; c) *Lactobacillus* sp. exercită un efect anticancerigen prin inhibarea creşterii celulelor tumorale şi prin inhibarea creşterii bacteriilor, care prin activitatea lor enzimatică eliberează subtanţe cancerigene din complexe inofensive.

Gnotobioza şi animalele gnotobiotice

Conceptul de animal axenic ("germ-free") a fost enunţat de Pasteur (1885). El considera că viaţa animalelor este imposibilă în absenţa microorganismelor. Abordările experimentale ale lui Thierfelder şi Nuttall (1895) au invalidat concepţiile lui Pasteur. Reyniers (1949) a stabilit condiţiile tehnice speciale pentru obţinerea animalelor gnotobiotice.

Terminologia utilizată în studiile de gnotobiologie a fost propusă de Reyniers (1949) şi completată de Luckey (1965) şi Gordon şi Pesti (1971).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Gnotobiotic (gr. *gnotos* = cunoscut) este animalul scos prin intervenție cezariană sau ecloziune sterilă din ou, crescut și menținut continuu în condiții de izolator, prin tehnici "germ-free".

Gnotofor - animal purtător al unei (unor) specii cunoscute de microorganisme inoculate în mod deliberat.

Axenic (steril sau germ-free) - animal lipsit de orice microorganism viabil.

Monognotofor - animal axenic, inoculat cu o singură specie cunoscută de microorganisme.

Dignotofor - animal axenic inoculat cu două specii de microorganisme cunoscute.

Gnotobiologie - biologia sistemelor în care sunt prezente numai specii cunoscute.

Convențional - animal crescut în condiții obișnuite, în mediu deschis, care conține *microorganismele asociate* tractului digestiv, pe tegument, etc.

Convenționalizate - animal axenic, trecut ulterior în condiții de viață liberă.

SPF ("*S*pecific *p*athogen *f*ree") - animale purtătoare ale unei microbiote convenționale normale, absența oricărui microorganism patogen cunoscut.

Obținere. Mamiferele "sterile" se obțin prin intervenție chirurgicală cezariană, în spațiu steril, urmată de histerectomie și transferul uterului în camera sterilă a unui izolator, în care este eliberat noul-născut. Ouăle aflate la sfârșitul perioadei de incubare sunt supuse unei băi germicide, iar ecloziunea are loc într-un dispozitiv sterilizat.

Sistemul izolator de creștere este alcătuit din mai multe compartimente ermetic închise. Fluxul de aer, hrană și apă sunt sterilizate.

Au fost crescute în condiții axenice, gândaci și melci, rațe, găini și prepelițe, șoareci, șobolani, cobai, iepuri, oi, câini, porci, bovine, maimuțe și ponei. Ele au fost păstrate în condiții de sterilitate microbiologică mai multe generații, cu un comportament aparent normal.

Caracteristicile animalelor "germ-free"

Animalele axenice sunt, în esență, animale normale, care diferă de cele convenționale prin absența microbiotei asociate.

Din punctul de vedere al ratei de creștere, al capacității de reproducere și al longevității sunt comparabile celor convenționale sau chiar superioare. Fenomenele de îmbătrânire sunt mai lente, sau durata vieții este chiar prelungită (găini, maimuțe).

Organele care sunt în contact continuu și intim cu microorganismele sau cu antigene provenite din acestea (ficatul, intestinul, ganglionii limfatici), sunt mai mici decât la animalele convenționale. În schimb, cecum-ul la rozătoare și gușa, oasele și intestinul gros la puii de găină sunt mai mari decât la animalele convenționale.

Cecum-ul la rozătoare (șoarece, șobolan, cobai) este mult mărit la animalele axenice, iar conținutul său este de 5 ori mai mare decât la animalele convenționale. Dimensiunile sale revin la normal după inocularea animalelor cu *E. coli, Proteus vulgaris, Streptococcus faecalis*, etc. Microbiota ar avea rolul de asigurare a tonusului peretelui intestinal.

Ganglionii limfatici, la animalele axenice sunt subdezvoltați, iar numărul limfocitelor este redus. Concentrația imunoglobulinelor este de numai 15 - 50% din normal. Sinteza lor este indusă de antigene bacteriene sau de altă natură, prezente în hrana sterilizată, capabile să inducă imunizarea după administrarea orală.

Pleasants (1973) a obținut animale cu stare imunitară de bază, în absența oricărei stimulări antigenice ("antigen-free"), prin hrănire cu o dietă hidrosolubilă (aminoacizi, glucoză, vitamine, săruri minerale, etc.). La organismele "antigen-free", concentrația imunoglobulinelor este nedetectabilă prin tehnicile obișnuite.

Rolul microbiotei normale

Studiile experimentale asupra animalelor axenice au arătat că microbiota normală, în special intestinală exercită efecte benefice asupra organismului gazdă:

- stimulează dezvoltarea organelor cu care vine în contact direct;
- sintetizează vitamine (vitamina K, acidul folic, acidul nicotinic, biotina, riboflavina, piridoxina, tiamina, acidul pantotenic), necesare metabolismului gazdei;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- stimulează mecanismele de apărare ale gazdei;

- favorizează menţinerea stării generale a gazdei, împiedicând implantarea în intestin a unor microorganisme patogene;

- degradează compuşi chimici alimentari, care nu pot fi hidrolizaţi de sucurile digestive;

- favorizează eliminarea fecală a colesterolului.

Deşi microbiota exercită efecte favorabile multiple asupra organismului gazdă, ea nu este esenţială, nu este indispensabilă pentru viaţa acestuia. Datorită evoluţiei îndelungate, s-a creat o stare de dependenţă a gazdei de anumiţi stimuli, în special bacterieni. La ierbivorele rumegătoare, microbiota este esenţială pentru digestie şi pentru existenţa animalului, datorită absenţei celulazelor din sucurile digestive

C. PROPRIETĂŢILE MICROORGANISMELOR PATOGENE

Din numărul mare de microorganisme existente în natură, un număr limitat sunt capabile să se dezvolte în asociaţie cu organismele superioare, iar dintre acestea, un număr restrâns (câteva sute) sunt *patogene*.

Bacteriile patogene au două proprietăţi definitorii: *patogenitatea* şi *virulenţa*. Cei doi termeni au semnificaţie distinctă: patogenitatea defineşte capacitatea potenţială a unui microorganism de a iniţia un proces infecţios, dar nu o face decât dacă este suficient de virulent pentru a depăşi barierele de apărare a organismului şi a pătrunde în ţesuturi.

Patogenitatea

Patogenitatea este proprietatea unui microorganism de a determina în condiţii naturale sau experimentale, apariţia unui proces infecţios, decelabil din punct de vedere clinic, la o gazdă receptivă.

În mod obişnuit, patogenitatea este asociată, inexact, cu modul de viaţă parazitară a microorganismelor, dar calitatea de patogen nu se asociază totdeauna cu parazitismul. Majoritatea bacteriilor patogene sunt parazite, iar *in vitro* se dezvoltă ca saprobionte pe medii organice, uneori cu o compoziţie chimică complexă. Unele bacterii, deşi sunt strict saprobionte, adică se dezvoltă pe materia organică în mediile naturale (de exemplu, *Cl. botulinum*), dar nu sunt parazite, produc totuşi efecte patologice prin intermediul exotoxinelor pe care le secretă.

Patogenitatea este un caracter de specie. De exemplu, *B. anthracis, C. diphteriae, S. typhi, M. tuberculosis* sunt patogene, chiar dacă unele sunt condiţionat patogene, adică determină apariţia unui proces infecţios numai dacă sunt inoculate în doze foarte mari sau dacă organismul are o rezistenţă generală scăzută. Alte specii nu sunt niciodată patogene, pentru că nu au capacitatea de a stabili interacţiuni cu organismele superioare: *Azotobacter, Nitrobacter, Acetobacter* etc.

Patogenitatea implică existenţa a patru proprietăţi esenţiale:

a) capacitatea de a pătrunde, de a se localiza în organismul gazdei;

b) proprietatea de a se multiplica în ţesuturile acesteia şi de a le invada;

c) rezistenţa la mecanismele de apărare a gazdei;

d) producerea leziunilor tisulare care se pot exterioriza clinic.

Una din trăsăturile esenţiale ale unui microorganism patogen este capacitatea de a recepţiona permanent condiţiile de mediu şi de a coordona activitatea genelor în raport cu informaţiile primite. De exemplu, agenţii patogeni care se transmit prin apă sau prin alimente trebuie să se adapteze condiţiilor mediului extern, cât şi celor din organismul sensibil.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Adaptabilitatea patogenilor este ilustrată de *Ps. aeruginosa* (bacilul piocianic), care trăieşte în sol, în apă, dar în ţesuturile organismului uman. *Ps. aeruginosa* supravieţuieşte în diferite soluţii, în care substanţele nutritive se găsesc în cantităţi infime chiar în soluţiile dezinfectante. Organismul uman, în mod obişnuit, împiedică colonizarea pseudomonadelor, dar la persoanele imunocompromise, în rănile provocate de arsuri sau de traumatisme, ca şi în plămânul pacienţilor cu fibroză chistică, *Ps. aeruginosa* este prezent totdeauna.

Virulenţa

Virulenţa este capacitatea unei tulpini a unui microorganism patogen aflat într-o anumită fază de creştere, de a se localiza (a coloniza), de a se multiplica eventual de a invada celulele şi ţesuturile gazdei sau de a produce toxine, determinând o stare patologică la o gazdă receptivă.

Virulenţa este o proprietate *multifactorială*, care exprimă cantitativ, gradul de patogenitate a unei tulpini pentru o anumită gazdă.

Virulenţa este o proprietate biologică corelată cu anumite caractere de structură (prezenţa flagelilor, fimbriilor), cu prezenţa unor proteine membranare sau cu unele particularităţi celulare fiziologice de sinteză.

Factorii de virulenţă bacteriană pot fi asociaţi celulei (fiind componente anatomice sau moleculare ale suprafeţei) sau sunt factori extracelulari (exotoxine, enzime extracelulare). Unele componente ale suprafeţei celulare au rol de *factori de colonizare*, iar altele au rol de *chemosenzori* şi induc transcrierea genelor de virulenţă.

Bacteriile utilizează mecanismele de recepţie a modificărilor mediului prin intermediul chemosenzorilor şi de răspuns, prin modificarea activităţii genelor. Unele dintre acestea sunt variante funcţionale ale operonului lactozei. De exemplu, transcrierea multor gene pentru toxine este reglată de Fe. Fe se leagă de receptor şi complexul receptor-Fe se asociază situsului operator, inhibând astfel transcrierea.

Virulenţa bacteriilor patogene este condiţionată de trei factori:

- infecţiozitatea (sau capacitatea de colonizare);
- agresivitatea (sau invazivitatea);
- toxigenitatea.

a) *Infecţiozitatea*

Infecţiozitatea reprezintă capacitatea unui microorganism de a depăşi mijloacele de apărare a organismului, de a se implanta şi de a coloniza ţesuturile sănătoase, adică de a stabili o localizare şi de a forma un focar primar de infecţie.

Colonizarea ţesutului de către un microorganism patogen este o fază iniţială critică pentru evoluţia procesului patologic şi este un fenomen complex, care implică atât implantarea cât şi utilizarea substanţelor nutritive disponibile în mediul gazdei.

Pentru a iniţia procesul infecţios, bacteriile trebuie să *adere* de celulele gazdei. Aderenţa este mediată de structuri specializate ale suprafeţei bacteriene, cunoscute sub denumirea generică de *adezine*. Suportul aderenţei bacteriene este reprezentat, în primul rând, de celulele epiteliale.

Interacţiunea celor mai multe adezine cu receptorii de suprafaţa ai celulei sensibile este specifică şi selectivă. Structurile bacteriene de aderenţă, anatomice sau moleculare sunt, de cele mai multe ori, adaptative. Ele dispar prin cultivarea succesivă *in vitro*. De aceea, tulpinile bacteriene de laborator sunt mai puţin aderente de suport, comparativ cu izolatele bacteriene recente.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aderența celulelor bacteriene de celulele gazdei

Legarea bacteriilor patogene de celulele sensibile este etapa inițială a procesului infecțios. Aderența împiedică îndepărtarea bacteriilor prin fluxul secrețiilor, prin tuse, prin motilitatea cililor sau prin peristaltism.

Aderența asigură colonizarea anumitor situsuri din organism, multiplicarea bacteriilor, sinteza toxinelor și desfășurarea reacției inflamatorii.

Bacteriile aderă în special de epiteliile mucoaselor, dar și de epiteliile keratinizate, de endotelii, oase, dinți etc. Uneori, aderența are un grad înalt de selectivitate, alteori este nespecifică. Aderența implică interacțiunea situsurilor complementare de pe suprafața celor două tipuri de celule: epitelială și bacteriană.

Cele mai multe bacterii au o sarcină netă negativă a suprafeței lor, dar au și zone limitate electropozitive, precum și molecule cu caracter hidrofob. Prezența grupărilor cu sarcini opuse a moleculelor hidrofobe, asigură interacțiunea celulei bacteriene cu suprafața celulei epiteliale.

Aderența reprezintă un avantaj ecologic major pentru bacteriile patogene, cu privire la asigurarea nutrienților, protecția față de anticorpi și lizozim etc. Multiplicarea lor, după aderență, are loc cu o rată net superioară față de a celulelor neaderente.

Mecanismele aderenței bacteriene *in vivo* au fost studiate în special pentru bacteriile generatoare de carii dentare. Aderența celulelor bacteriene patogene, de celulele sensibile, implică participarea a doi factori: o adezină localizată pe suprafața bacteriei și un receptor de pe suprafața celulei gazdă.

Adezinele

Capacitatea agenților patogeni de a adera de suprafața celulelor sensibile este mediată de structuri de suprafață, denumite generic *adezine*.

Principalele tipuri de adezine. Adezinele bacteriene se împart în două mari categorii: a) *adezine de natură proteică; b) adezine neproteice.*

Grupul adezinelor *proteice* cuprinde *fimbriile*. Acestea sunt structuri filamentoase, neflagelare ale suprafeței celulare și sunt diferite de pilii participanți la conjugare. Fimbriile fac parte din categoria lectinelor și se găsesc numai la bacteriile Gram negative. Ele se leagă de receptori specifci ai membranei celulare. Fimbriile care aparțin aceluiași tip sunt formate din molecule proteice identice. Diferitele variante fimbriale se deosebesc prin lungimea filamentului și prin greutatea moleculară a monomerilor polipeptidici constitutivi.

În același grup este inclusă o categorie de *proteine* din structura membranei externe a bacteriilor Gram negative, care îndeplinesc funcția de adezine.

Grupul adezinelor *neproteice* cuprinde structuri diferite de cele enumerate mai sus. Cele mai comune adezine neproteice sunt *polizaharidele* care intră în structura unei rețele de tip *glicocalix*, de tip *capsular* sau a unei structuri de tipul *stratului mucos*. Ele sunt prezente la bacteriile Gram pozitive și Gram negative.

Alte adezine sunt *acizii lipoteichoici*, caracteristici bacteriilor Gram pozitive, ancorați de glicolipidele membranare. Sunt structuri moleculare filamentoase, foarte asemănătoare fimbriilor, cu rol de aderență de substrat. La *Str. pyogenes*, acizii lipoteichoici au efect sinergic cu proteina M.

Adezinele neproteice sunt mai puțin eficiente în medierea proceselor de aderența bacteriană, comparativ cu adezinele proteice. Polizaharidele capsulare, în anumite cazuri favorizează aderența, iar alteori au efect invers (de exemplu, polizaharidele împiedică aderența celulelor de *H. influenzae, N. meningitidis* sau *P. multocida* tip A).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Adezinele polizaharidice ca factori de virulenţă

Exopolizaharidele formează structuri capsulare la multe bacterii patogene şi au consistenţa de geluri hidratate. Ca factori de virulenţă, exopolizaharidele au două roluri majore:

a) *Aderenţa de substratul tisular*. După Gristina şi colab. (1985), atât suprafaţa celulei bacteriene cât şi a substratului tisular sunt polianionice. Sarcinile electrice asemănătoare determină respingerea celulei bacteriene de către substratul tisular. Forţele de respingere sunt contracarate de forţele de atracţie London-van der Waals. Ele permit realizarea unor interacţiuni hidrofobe între moleculele suprafeţei bacteriene şi ale celulei gazdă. Exopolizaharidele bacteriene intensifică interacţiunile dintre liganzii bacterieni şi tisulari. Astfel, ţesutul este acoperit de un biofilm, în care agregatul de celule bacteriene, înconjurat de o matrice moleculară aderă strâns de substrat.

b) *Protecţia celulei bacteriene* faţă de sistemele de apărare a gazdei. Capsula împiedică fagocitarea pentru că bacteriile capsulate formează microcolonii şi înglobarea lor de către fagocite devine dificilă. Cu cât suprafaţa celulei bacteriene este mai hidrofilă, cu atât este mai greu fagocitată. Pe de altă parte, complementul şi anticorpii nu au acces la suprafaţa celulei. Unele specii bacteriene produc o capsulă, a cărei compoziţie chimică este asemănătoare componentelor tisulare. O astfel de capsulă camuflează celula bacteriană faţă de sistemul imunitar. De exemplu, capsula de la *Str. pyogenes Pasteurella multocida* conţine acid hialuronic.

Matricea moleculară polizaharidică, cu structură fibroasă favorizează creşterea celulelor şi stabilitatea biofilmului. Stabilitatea biofilmului asigură formarea continuă de microcolonii, persistenţa şi extinderea infecţiei cronice. Din structura sa "scapă" periodic celule bacteriene care trec în sânge sau în lichidele tisulare adiacente, favorizând extinderea infecţiei.

Receptori de adezine

Interacţiunea dintre celula epitelială sensibilă şi adezinele bacteriene este mediată de *receptorii de adezine* şi se bazează pe principiul complementarităţii spaţiale. Uneori, interacţiunea este nespecifică, ceea ce explică faptul că unele specii bacteriene (*Salmonella, Yersinia*) infectează atât celulele intestinale umane, dar şi liniile celulare de *Drosophyla*. Alteori, interacţiunea are un grad înalt de specificitate. De exemplu, *Str.pyogenes* se localizează la nivelul epiteliului faringian şi foarte rar în tractul urinar, iar *E. coli* colonizează epiteliul intestinal al căilor urinare, dar foarte rar pe cel respirator.

Helicobacter pylori, un patogen specific uman aderă de celulele epiteliale ale mucoasei gastrice, dar nu de celulele profunde ale mucoasei sau ale colonului. Pe celulele epiteliului, *H. pylori* recunoaşte antigenul de grup sanguin Lewis, dar probabil şi alte molecule, deoarece *H. pylori* infectează şi persoane negative pentru acest antigen. Un factor esenţial pentru colonizare este *ureaza*, pe care *H. pylori* o produce în cantităţi foarte mari. *In vitro*, celulele de *H. pylori* hidrolizează ureea, eliberând amoniul care neutralizează aciditatea şi permite colonizarea iniţială. Amoniul generat prin hidroliza ureii produce NH_4OH care se disociază şi ionul OH^- produce leziuni ale mucoasei.

Receptorii de adezine ai celulelor epiteliale sunt molecule din familia integrinelor, care îndeplinesc funcţii fiziologice importante: leagă proteine plasmatice, dar şi proteine din matricea extracelulară (fibronectine, fibrinogen, laminina, colagenul de tip I etc.).

Receptorii de adezine se situează la două nivele: sunt componente structurale ale suprafeţei celulei sau se găsesc la nivelul mucopolizaharidelor care tapetează totdeauna epiteliile mucoase.

Din punct de vedere chimic, receptorii de adezine sunt glicoconjugate: *glicoproteine* ale membranei celulare sau ale stratului mucopolizaharidic şi *glicolipide* din structura membranei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Glicoproteinele şi glicolipidele proemină la suprafaţa membranei celulare şi expun la exterior catene oligozaharidice mai mult sau mai puţin complexe, cu rol de receptori de adezine.

Glicoproteinele din stratul mucopolizaharidic au greutăţi moleculare cuprinse între $2 \times 10^5 - 15 \times 10^6$ şi sunt formate din catene polipeptidice legate prin punţi S-S. Catena oligozaharidică este formată din N-acetil-galactozamină, N-acetil-glucozamină, fucoză, galactoză şi acid sialic. Glicoproteinele din mucus se găsesc şi în secreţii (salivară, digestive).

Glicoproteinele membranare se deosebesc de cele din mucus: N-acetil-galactozamina lipseşte, locul ei fiind luat de manoză şi de acizii uronici. Catenele glicoproteice ale mucusului şi ale suprafeţei celulare sunt asemănătoare cu cele ce se găsesc pe suprafaţa eritrocitelor şi formează antigenele de grup sanguin. Aşa se explică proprietăţile hemaglutinante pe care le posedă anumite adezine bacteriene, dacă receptorul lor celular se găseşte pe hematii.

Glicoconjugatele pot avea rol de receptori pentru toxine. De exemplu, glicolipidul GM_1, prin componenta sa oligozaharidică este receptor specific al toxinei holerice.

Detectarea localizării receptorilor glicoproteici şi glicolipidici pe suprafaţa celulei este posibilă prin utilizarea lectinelor. Lectinele sunt glicoproteine ce se combină specific cu un rest oligozaharidic. Lectinele cuplate cu un derivat fluorescent sunt utilizate pentru a studia repartiţia receptorilor suprafeţei celulare.

Modularea expresiei proprietăţilor de aderenţă se poate face, teoretic prin intervenţie la nivelul receptorilor celulari, blocând direct activitatea lor, cu analogi structurali ai adezinei bacteriene. A II-a modalitate de intervenţie este blocarea activităţii adezinei, cu anticorpi specifici anti-adezină, fie utilizând antibiotice la doze subinhibitorii. De exemplu, aderenţa streptococilor poate fi inhibată *in vitro*, dacă la mediul de reacţie se adaugă acid lipoteichoic, analogul structural al adezinelor acestor bacterii.

Inhibiţia aderenţei prin utilizarea analogilor structurali ai receptorilor celulari s-a demonstrat pentru *S. typhimurium Sh. flexneri*. D-manoza, adăugată în mediul de reacţie inhibă aderenţa lor de eritrocitele de cobai. Bacteriile poartă fimbrii de tip I, al căror receptor celular este manoza.

Blocarea parţială sau totală a adezinei prin intermediul anticorpilor specifici este considerată ca o modalitate eficientă de protecţie. Astfel, starea imunitară postvaccinală sau consecutivă unei infecţii, asigură o protecţie bună faţă de o infecţie ulterioară cu acel agent sau cu alţi agenţi care au adezine comune.

Utilizarea antibioticelor la doze subinhibitorii este o modalitate de a modifica expresia adezinelor. Dozele subinhibitorii blochează parţial sau total, biosinteza unor constituienţi ai suprafeţei celulare, antrenând modificări ale anumitor proprietăţi, inclusiv a celor de aderenţă.

Receptorii celulari de adezine se modifică, atât cantitativ cât şi calitativ. Astfel, celulele infectate cu virusuri pot să exprime noi receptori de suprafaţă, absenţi pe celulele normale. Fenomenul modulării expresiei receptorilor ar explica incidenţa crescută a infecţiilor bacteriene postvirale (de exemplu, pneumonia bacteriană postvirală). Astfel, organismul gazdă devine sensibil la diferite infecţii bacteriene, în timpul şi după anumite infecţii virale.

Sideroforii ca factori de virulenţă

Sideroforii sunt molecule mici, care au în structura lor, grupări caracteristice de tipul catechol, fenolat sau hidroxamat. Ei au o structură moleculară caracteristică, definită funcţional ca o "cuşcă moleculară", cu rolul de a lega Fe.

Fe este legat în centrul sideroforilor cu o afinitate echivalentă celei de legare cu transferina. Sideroforii pot prelua ionii de Fe chiar din compuşii minerali, ca hematita.

Multiplicarea bacteriilor este condiţionată de prezenţa obligatorie a Fe^{2+} (forma accesibilă metabolismului). Fe este necesar desfăşurarii unor variate reacţii enzimatice,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

esențiale pentru creștere, fiind un cofactor de sine stătător sau parte a unui grup prostetic, în special de tip *hem*. Fe este un component esențial al catenei de transport al electronilor în membrana celulară.

În mediile naturale, ca și în organismul uman și animal, Fe se găsește în cantități suficient de mari pentru a asigura creșterea microorganismelor, dar este în forme inaccesibile. Astfel, concentrația normală a Fe în plasma mamiferelor (mai mică de lo μM) este satisfăcătoare pentru creșterea și multiplicarea bacteriilor, dar numeroși factori îl fac inaccesibil microorganismelor. Practic, Fe disponibil lipsește. Un deficit parțial al Fe are efect bacteriostatic, iar deficitul major are efecte letale, prin inhibiția sintezei proteinelor. Fe anorganic este insolubil în aerobioză la pH fiziologic.

În mediile naturale, Fe este legat de *agenți chelatori* (compuși chimici în care un ion metalic multivalent este captat, sechestrat și legat în structura ciclică a agentului chelator). În organismul uman și animal, Fe este legat în complexe organice cu proteinele (feritina, hemosiderina, gruparea hem), cu glicoproteine extracelulare (lactoferina din lapte, saliva, lacrimi), precum și cu transferina din sânge și limfă. Toate aceste molecule au o mare afinitate de asociere cu Fe și în mod normal sunt parțial saturate. Transferina, proteina majoră de transport a Fe în plasma sanguină are ocupată numai 3o% din capacitatea sa de legare.

Proteinele de legare reduc concentrația Fe^{3+} liber în organism, la valori foarte scăzute. De aceea, serul sanguin uman este bacteriostatic.

Din aceste cauze, bacteriile au elaborat mecanisme adaptative prin care mobilizează Fe și îl disponibilizează pentru activitățile celulei. La *E. coli*, în condițiile de restricție a Fe, translocația Fe^{3+} în celulă și conversia sa în forma utilizabilă (Fe^{2+}) se face prin două mecanisme:

l) Sinteza și secreția sideroforilor. Complexul Fe^{3+} siderofor, datorită dimensiunilor sale nu poate trece prin canalele membranei celulei bacteriene. Complexul este recunoscut de un receptor situat în membrana externă, prin intermediul căruia este transferat în celulă, într-o formă accesibilă metabolismului. Transferul membranar al Fe^{3+} este asociat cu reducerea lui la forma feroasă (Fe^{2+}), iar sideroforul rămâne la nivelul receptorului.

Sideroforii se găsesc nu numai la bacteriile patogene, ci constituie mecanisme eficiente de obținere a Fe în tot regnul procariotelor. În funcție de specie, ei sunt factori cu diferite grade de virulență.

2) Un alt mecanism de preluare a Fe este propriu unor bacterii patogene care colonizează mucoasele (*Neisseria, Bordetella*). Ele nu secretă siderofori, dar preiau Fe pe o cale directă, prin contactul selectiv între componentele membranei externe, cu proteinele care leagă Fe (transferina, lactoferina sau chiar hemoglobina). *Neisseria* sp. *H. influenzae* utilizează ca surse de Fe numai transferina și lactoferina umană, ceea ce ar explică specificitatea lor pentru gazdele primate.

Fe are nu numai un rol fiziologic deosebit, dar multe bacterii îl utilizează pentru activarea unor factori de virulență: toxine, adezine, invazine.

b) *Agresivitatea (Invazivitatea)*

Puterea de invazie (agresivitatea sau invazivitatea) reprezintă capacitatea agenților patogeni de a depăși prin mecanisme specifice, barierele epiteliale, de a pătrunde în țesuturile gazdei și de a se multiplica, producând efecte patologice.

Agresivitatea bacteriilor patogene este mediată de *invazine*, o categorie de proteine asociate suprafeței celulare. Ele formează apendice celulare evidențiate la microscopul electronic (fimbrii și flageli) sau constituie un strat subțire, înalt organizat la suprafața celulei. Invazinele ușurează răspândirea bacteriilor în organism, după fixarea și multiplicarea lor la poarta de intrare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Flagelii ca organite de motilitate, sunt în acelaşi timp invazine, deoarece conferă un avantaj evident şi celulelor bacteriene care trebuie să traverseze stratul vâscos de mucus, pentru a ajunge la celulele epiteliale ale tractului digestiv.

Fimbriile, la bacteriile patogene, au rol de adezine bacteriene, dar în aceiaşi măsură ele constituie şi un factor de agresivitate, deoarece conferă un grad de protecţie a celulei faţă de factorii de apărare a gazdei.

Unele invazine produc efect *necrotic* sau determină alte modificări care favorizează colonizarea tisulară progresivă. De exemplu, unele bacterii produc *hialuronidaza* şi alte enzime cu efect hidrolitic faţă de polimerii din substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv, favorizând astfel intrarea bacteriilor în vasele sanguine şi limfatice. Enterobacteriile au mecanisme proprii de invazie. Agenţii patogeni enterici străpung bariera mucoasei intestinului subţire, prin motilitate flagelară, la nivelul unor celule epiteliale specializate, denumite celule *M* (*M*icrofold). Ele acoperă plăcile Peyer şi pinocitează materialul luminal sub formă solubilă, pe care îl transferă macrofagelor subiacente. Macrofagele prelucrează antigenele şi le prezintă limfocitelor. Celulele *M* sunt considerate ca un sistem timpuriu de avertizare a sistemului imunitar. Ele sunt acoperite cu un strat mucos subţire, microvili scurţi, dar sunt foarte active din punct de vedere al pinocitozei, comparativ cu celulele epiteliale columnare. Au puţini lisosomi şi materialele înglobate nu sunt supuse degradării. Deşi celulele *M* au evoluat ca un sistem protector strategic, proprietăţile lor funcţionale le conferă calitatea unor adevărate porţi de intrare – un „călcâi al lui Achile" al intestinului, deoarece bacteriile patogene dobândesc acces spre structurile profunde.

S. typhi, adeseori produce perforaţii intestinale şi probabil, leziunile cauzate la nivelul plăcilor Peyer sunt sursa acestor perforaţii. Celulele *M* emit pseudopode şi înglobează bacteriile în vacuole membranare.

La nivelul intestinului gros, nazofaringelui şi bronhiilor se găsesc structuri echivalente celulelor M, situsuri la care are loc invazia agenţilor patogeni.

Bacteriile care au o mare putere de invazie produc, în general, infecţii generalizate ale organismului. Capacitatea de invazie poate lipsi la unele bacterii, care fiind foarte toxigene pot produce efecte letale prin intoxicaţie.

c) *Toxigenitatea*

Toxigenitatea (toxigeneza) reprezintă capacitatea unui agent patogen de a elabora în cursul creşterii sale, una sau mai multe subtanţe toxice. Toxigeneza este o proprietate esenţială a patogenităţii bacteriene.

Sub denumirea de toxină sunt cuprinse toate subtanţele toxice de provenienţă biologică (sintetizate de bacterii, fungi, celule vegetale sau animale). Termenul de "toxină" derivă din cuvântul grecesc "toxicon", care înseamnă *otravă*.

Se cunosc circa 140 de toxine proteice, din care 2/3 sunt produse de bacteriile Gram pozitive. Unele specii bacteriene produc între 5–10 tipuri de toxine.

Capacitatea de a elabora toxine nu este limitată la bacteriile patogene propriu-zise. Numeroase saprobacterii produc subtanţe toxice, uneori foarte puternice (de exemplu, toxina botulinică produsă de *Cl. botulinum*). Toxigenitatea bacteriană variază în cadrul aceleiaşi specii şi este dependentă de condiţiile de mediu.

Clasificarea toxinelor

Pentru a-şi exercita efectul, toxinele trebuie să se elibereze din celule şi să se solubilizeze în umorile organismului. După sinteză, toxinele pot rămâne asociate permanent sau temporar cu celula sau sunt eliminate la exterior. Aceste diferenţe sunt dependente, în primul rând de specia

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

producătoare, precum şi de fazele succesive ale evoluţiei unei populaţii bacteriene: de creştere exponenţială, staţionară sau de declin. Chiar toxinele care în faza exponenţială a culturii bacteriene sunt asociate celulei, în faza de declin se găsesc libere în mediul extracelular datorită lizei celulelor. Din această cauză, studiul raportului topologic între celulă şi toxină are semnificaţie numai pentru faza de evoluţie a culturii bacteriene. Din acest punct de vedere se disting următoarele categorii de toxine:

a) *toxine localizate în celulă* (citoplasmatice) produse de bacterii Gram negative (*Sh. dysenteriae, Y. pestis, B. pertusis, E. coli* etc.) şi Gram pozitive (enterotoxina produsă de *Cl. perfringens*, streptolizina S, pneumolizina produsă de *S. pneumoniae*, o toxină sintetizată de *Cl. difficile*). Toate sunt de natură proteică;

b) *toxinele constitutive ale peretelui celular*, produse numai de bacteriile Gram negative şi care corespund *endotoxinelor* clasice. Din punct de vedere chimic, endotoxinele sunt complexe glicolipidice sau glicolipoproteice. Ele nu sunt niciodată eliberate în cursul fazei de creştere exponenţială, ci numai prin dezagregarea peretelui celular;

c) *toxinele eliminate* în mediul extern sau *exotoxinele* propriu-zise sunt de natură proteică şi sunt produse mai frecvent de bacteriile Gram pozitive (toxina difterică, toxinele stafilococice, toxina de *B. anthracis* etc.), dar şi de cele Gram negative (*V. cholerae, Ps. aeruginosa*);

d) *toxinele cu localizare mixtă* (endocelulară şi exocelulară), în funcţie de faza de evoluţie a culturii bacteriene. În faza exponenţială, toxinele sunt secretate parţial în mediu, dar o fracţie semnificativă rămâne în interiorul celulei şi este eliberată prin autoliză (toxinele tetanică, botulinică).

Mult timp s-a considerat că exotoxinele sunt de natură proteică, iar endotoxinele – de natură lipopolizaharidică. Aceasta diferenţiere nu este netă, deoarece unele toxine proteice aparţin categoriei endotoxinelor, fiindcă rămân asociate celulei producătoare şi invers, uneori, toxinele de natură lipopolizaharidică sunt eliminate la exterior ca exotoxine. De aceea, clasificarea toxinelor trebuie să se facă după criteriul compoziţiei chimice. Din acest punct de vedere, majoritatea sunt de natură proteică, iar majoritatea endotoxinelor sunt de natură lipopolizaharidică.

În raport cu tropismul lor se disting *neurotoxine, enterotoxine, cardiotoxine*, cu efecte limitate la ţesutul respectiv sau toxine *pantrope*, cu efecte asupra multor categorii de ţesuturi.

Exotoxine

Comparativ cu alte subtanţe toxice, exotoxinele bacteriene au o toxicitate foarte înaltă, atât în stare brută sub forma filtratelor de cultură, dar mai ales în forma purificată. Astfel, toxina botulinică de tip D este de trei milioane de ori mai puternică decât stricnina luată ca etalon. Efectul toxic este variabil nu numai în funcţie de specia bacteriană producătoare, ci şi de tulpină, chiar pe medii optime. În multe cazuri, toxigeneza se atenuează sau chiar dispare prin subcultivare repetată.

În general, efectul toxinelor este variabil în funcţie de natura, vârsta, greutatea, sexul şi linia genetică a animalelor pe care sunt testate, ca şi de tehnica şi calea de administrare folosite.

Datele referitoare la toxigeneza se referă la administrarea lor parenterală, deoarece cu excepţia enterotoxinelor, toxinele uzuale sunt distruse de modificările de pH sau de activitatea enzimelor digestive.

Potenţialul toxic al toxinelor este ilustrat de date teoretice:

1) toxina botulinică de tip A purificată şi cristalizată ar conţine într-un miligram, 1 200 000 DLM (doze limite mortale) pentru un kg corp cobai, ceea ce înseamnă că 1 mg de toxină poate să omoare 1 200 tone de cobai sau două milioane de şoareci;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) 100 – 198,422 g neurotoxine (botulinică sau tetanică) ar putea omorî întreaga populaţia a globului.

Potenţialul toxic al toxinelor bacteriene este dependent de calea de administrare. Dozele letale pentru căile respiratorie şi digestivă sunt de 100 – 1000 de ori mai mari decât pentru căile intravenoasă, intramusculara, intraperitoneală sau subcutanată. Pielea intactă este o barieră eficientă faţă de toxine.

Determinismul genetic al sintezei toxinelor

Sinteza toxinelor bacteriene este codificată de gena *tox*, a cărei localizare este cromosomală, plasmidială sau fagică. La *V. cholerae*, gena *tox*, codificatoare a enterotoxinei este localizată pe cromosom şi prezintă patru alele, care determină sinteza a patru variante antigenice. La *Cl. botulinum*, gena *tox*, cu situs cromosomal prezintă mai multe alele, care codifică sinteza a 7 serotipuri de toxină (notate A → G), care nu dau reacţie încrucişată semnificativă cu anticorpii obţinuţi faţă de una dintre ele.

Enterotoxinele şi hemolizinele de *E. coli*, toxina dermo-exfoliativă stafilococică sunt codificate de gene plasmidiale.

Gena *tox*, codificatoare a toxinei difterice este localizată în genomul unor bacteriofagi ADN (beta, P, 1, W). Activitatea ei este controlată de o genă situată pe cromosomul bacterian.

Fagii purtători ai genei *tox* se găsesc în celulele de *C. diphteriae* în stare integrată (profag), de fag virulent replicativ sau sub formă de replicon autonom represat. Este cunoscut modul de funcţionare a genei *tox*, purtată de fagul beta, ce se integrează ca profag. Ea se găseşte aproape de situsul de inserţie a genomului fagic în cromosomul bacterian, dar are propriul său promotor şi se poate exprima independent de alte gene fagice, dar poate fi represată fără să afecteze biosinteza altor proteine fagice. Această genă nu pare a fi esenţială pentru genomul fagic. Modificarea ei mutaţională nu afectează ciclul de replicare a fagului. Se consideră că gena *tox* a acestui fag este de origine bacteriană, care a fost mobilizată prin procesul de transducţie fagică.

Sinteza toxinei eritrogene streptococice (scarlatinoasă), precum şi a toxinelor botulinice C şi D este codificată de fagi temperaţi. La *Cl. perfringens*, toxigeneza este legată temporal de procesul sporulării. Sporularea este o condiţie obligatorie, dar insuficientă pentru producerea toxinei. Toxina pare a fi un produs al unei gene de sporulare şi este o proteină de structură a tunicii sporale.

Sinteza şi eliberarea toxinelor

Majoritatea toxinelor de natură proteică sunt *exotoxine*. Ele sunt sintetizate şi eliberate numai de celulele care cresc, aflate în fază logaritmică şi de încetinire a ritmului de creştere. Exotoxinele apar în mediul extracelular imediat după debutul sintezei, sau după o anumită perioadă, dar concentraţia lor în mediul extracelular nu creşte semnificativ în faza staţionară sau cea de declin.

Sinteza lor pare să se facă după un mecanism comun cu sinteza enzimelor extracelulare: ambele tipuri de molecule se sintetizează pe ribosomii ce tapetează faţa internă a membranei citoplasmatice.

Exotoxinele se sintetizează sub forma unor molecule precursoare, mai lungi decât proteinele-toxine extracelulare. Molecula precursoare are o secvenţă semnal hidrofobă, N-terminală de 15-30 de aminoacizi, cu rol de mediator al transferului membranar al moleculei. Secvenţa semnal este excizată de o peptidază membranară. Rezultă proteina hidrofilă, activă funcţional.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După sinteză, molecula de toxină este transferată prin peretele celular, adică prin rețeaua mureinică, iar la bacteriile Gram negative și prin membrana externă. Moleculele de exotoxine sunt mici, au puține legături disulfidice și o rigiditate scăzută, ceea ce favorizează transferul lor prin învelișurile celulare.

Eliberarea endotoxinelor, componente ale peretelui celular la bacteriile Gram negative este condiționată de autoliza sau distrugerea pe cale fizică sau chimică a celulei bacteriene.

Receptori celulari pentru toxine

Interacțiunea toxinelor cu celulele sensibile, asemenea altor biomolecule (hormoni, antigene, lectine, factori reglatori etc.) este mediată de molecule specifice denumite *receptori*, situate în stratul extern al membranei citoplasmatice. Celulele sensibile nu au receptori specifici pentru toxine, deoarece ele nu-și programează structuri moleculare pentru a se sinucide. Toxinele împrumută receptorii, care în mod obișnuit au rolul de a îngloba molecule utile metabolismului celular.

Se cunosc receptorii prin intermediul cărora, cateva toxine interacționează cu suprafața celulei. De exemplu, receptorul celular pentru streptolizina O este *colesterolul*, iar alte câteva toxine au ca receptori, moleculele de *gangliozide*. Acestea sunt *glicolipide*, mai abundente în neuroni, alcătuite dintr-o componentă oligozaharidică legată de un ceramid (acidul stearic și sfingozina). Gangliozidele diferă între ele, prin numărul și secvența resturilor glucidice componente, în special a acidului N-acetil neuraminic (NANA) sau acid sialic.

Toxina tetanică se leagă de gangliozide, în special de di- și tri-sialo-gangliozide, care conțin două respectiv trei resturi de acid sialic, atașate de galactoză. Între toxina tetanică și hormonul tireostimulator (TSH) există o competiție de legare strict reciprocă, pe membrana celulelor tiroidiene. Astfel s-a dedus că receptorul neuronal pentru toxina tetanică este asemănător cu receptorul celulei tiroidiene pentru TSH.

Receptorul celular pentru toxina holerică este o moleculă glicolipidică (GM_1). S-a observat o corelație directă între conținutul membranar în GM_1 și sensibilitatea tisulară la toxină.

Toxina termolabilă de E. coli, foarte asemănătoare toxinei holerice are același receptor membranar (glicolipidul GM_1).

Receptorul celular al toxinei de *B. pertusis* pare a fi tot o gangliozidă care conține acid sialic, iar receptorul toxinei difterice ar fi o glicoproteină.

În raport cu localizarea țintei lor moleculare se disting două nivele de acțiune a toxinelor:

- cele care au ținta finală la nivelul membranei;
- toxine a căror țintă finală este citoplasmatică.

Ținta finală este structura a cărei interacțiune cu toxina produce efectul toxic, în timp ce receptorul are uneori rolul de țintă intermediară, și alteori este chiar ținta finală.

Toxinele care acționează la nivelul *membranei* sunt active prin modificari structurale ale membranei citoplasmatice, urmate de ruperea acesteia. Consecința este *citoliza* ori moartea celulei. Toxinele care consecutiv acțiunii lor produc dezorganizarea membranei se numesc *citolizine* (respectiv hemolizine, dacă celula țintă este eritrocitul).

Toxinele a căror țintă finală este intracelulară, mai întâi traversează membrana citoplasmatică și ajung în citoplasmă.

Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă

Toxinele bacteriene a căror țintă este intracelulară sunt molecule bifuncționale, ca și toxinele vegetale (ricina, abrina), bacteriocinele sau hormonii glicoproteici. Toate aceste categorii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de molecule sunt alcătuite după acelaşi model funcţional: sunt monomere (de exemplu, toxina difterică, exotoxina de *P. aeruginosa*) sau sunt dimere (de exemplu, enterotoxina holerică şi cea termostabilă de *E. coli*). Cele monocatenare au un segment COOH-terminal, prin care se leagă la nivelul receptorului şi un segment NH_2-terminal, care pătrunde în citoplasmă şi interacţionează cu ţinta intracelulară. Pentru toxinele dublu catenare, funcţiile de legare (*B-B*inding) şi de activitate propriu-zisă (*A-A*ctivity) sunt realizate separat de fiecare catenă.

Pătrunderea moleculei de toxină în celulă se face prin unul din următoarele mecanisme; a) endocitoza mediată de receptori; b) pinocitoza nespecifică în fază lichidă; c) transferul direct al moleculei prin membrana citoplasmatică.

Înglobarea prin mecanismul endocitozei mediate de receptori conferă specificitate şi eficienţa acţiunii moleculelor mari. Receptorii celulari glicoproteici, după interacţiunea cu moleculele de toxină suferă o dinamică accentuată. În mod normal, moleculele cu rol de receptor sunt uniform distribuite în planul membranei sau sunt concentrate în teritorii specializate denumite zone *tapetate cu clatrină* (coated pits), un înveliş de natură proteică pe faţă citoplasmatică a membranei. După legarea moleculei de toxină, complexele receptor-toxină se aglomerează în zonele tapetate cu clatrină, situate la baza microvilozităţilor. Zonele respective se învaginează şi formează *vezicule acoperite cu clatrină*, cu rol de transport. În citoplasmă, învelişul de clatrină se dezorganizează şi receptorii celulari deveniţi disponibili sunt reciclaţi spre suprafaţa celulei, iar molecula de toxină este eliberată spre un situs intracelular specific.

Rolul exotoxinelor în patogeneza bacteriană

Efectul biologic al exotoxinelor este specific şi este datorat afinităţii lor caracteristice pentru anumite celule-ţintă ale organismului.

Unele toxine (tetanică, difterică, botulinică, holerică, eritrogenă) au un rol determinant în patogenitatea bacteriană. Primele patru enumerate mai sus sunt factori unici ai patogenităţii pentru bacteriile producătoare. În cazul holerei, gravitatea infecţiei este consecinţa efectelor fiziopatologice nespecifice ale toxinei asupra mucoasei intestinale, ce constau în pierderea apei şi sărurilor minerale la acest nivel.

Eritemul specific scarlatinos, produs de *Streptococcus pyogenes* se datorează efectului primar al toxinei eritrogene streptococice.

Enterotoxinele stafilococice şi enterotoxina produsă de *Cl. perfringens* produc efecte la nivelul mucoasei intestinale, ca rezultat al intoxicaţiei alimentare.

Toxina produsă de *Sh. dyzenteriae* este cauza dizenteriei, deoarece enterocitele şi celulele endoteliale ale vaselor mici se lizează sub acţiunea toxinei, rezultatul fiind ulcerarea mucoasei intestinale.

Exotoxina de *B. anthracis* produce un edem local şi hemoragie, iar în cazul septicemiei, efectul letal pare a fi datorat neurotropismului său, cu acţiune în special asupra centrului bulbar al respiraţiei.

Efectele biologice ale toxinelor se produc la nivelul diferitelor structuri celulare. De exemplu, hemolizinele, leucocidinele acţionează la nivelul membranei citoplasmatice, iar alte toxine sunt active asupra organitelor, asupra catenei transportoare de electroni ş.a.m.d.

Endotoxinele

Termenul de endotoxină (introdus de Pffeifer, 1892) este impropriu, deoarece lipopolizaharidele LPS) sunt componente ale suprafeţei celulei bacteriene Gram negative, dar este totuşi folosit pentru că, spre deosebire de exotoxine semnifică asocierea LPS cu celula.

Factorul toxic al bacteriilor Gram negative a fost extras de Boivin şi Mesrobeanu (1933). Ei au identificat complexul glicolipidic, cu antigenul somatic (O) al bacteriilor ce formează colonii netede (*S-S*mooth).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Endotoxinele LPS sunt componente structurale ale peretelui celular, la toate bacteriile Gram negative patogene şi se eliberează după dezintegrarea celulei. Sunt relativ termo-stabile şi mai puţin toxice decât exotoxinele, iar efectele lor sunt lipsite de specificitate. Din punct de vedere chimic, endotoxinele LPS sunt macromolecule complexe ce conţin fosfolipide şi polizaharide. Toxicitatea lor rezidă în fracţia fosfolipidică. Nu se denaturează şi nu rezultă anatoxine.

Endotoxinele LPS reprezintă 25% din moleculele de suprafaţă ale celulei şi sunt esenţiale pentru integritatea membranei externe.

Structura chimică a moleculei de LPS

Molecula de LPS este alcătuită dintr-un complex poliozidic şi o parte lipidică. De aici derivă proprietăţile amfipatice ale acestui agregat molecular, conferit de grupări polare hidrofile şi grupări apolare hidrofobe.

La microscopul electronic, filamentele LPS au o structură trilaminară, corespunzătoare celor două straturi poliozidice şi stratului lipidic.

Cele mai studiate LPS sunt cele produse se tulpinile de *Salmonella*. Din punct de vedere chimic, molecula LPS, după extracţia cu amestecul fenol-apă cuprinde trei regiuni distincte:

- regiunea polizaharidică externă, ce conferă specificitate serologică moleculei de endotoxină;
- regiunea centrală, reprezentată de oligozaharidul R;
- regiunea internă hidrofobă – lipidul A, prin care molecula LPS se ancorează în membrana externă.

Componenta lipidică conferă moleculei LPS, calitatea de toxină.

Oligozaharidul regiunii R şi lipidul A sunt relativ invariabile şi au constituienţi similari la diferite specii de bacterii Gram negative.

Polizaharidul regiunii externe este un polimer de unităţi oligozaharidice repetitive şi conferă specificitate serologică de grup, diferitelor variante antigenice de *Salmonella*. Unităţile oligozaharidice conţin 2-4 componente monozaharidice: D-manoza, D-galactoza, L-ramnoza, o dezoxihexoză, o didezoxihexoză. Didezoxihexozele sunt zaharuri care nu există în stare liberă în natură, dar intră frecvent în structura polizaharidului enterobacteriilor şi au primit denumiri care derivă de la speciile de origine: abequoza, tiveloza, paratoza, colitoza.

Variaţia antigenică a polizaharidului regiunii externe se amplifică pe următoarele căi:

- schimbări ale poziţiei legăturilor (de exemplu, 1-4 în loc de 1-6);
- configuraţii moleculare modificate;
- înlocuiri la nivelul diferitelor subunităţi repetitive;
- deleţia sau substituţia unui rest glucidic din subunităţile oligozaharidice.

Regiunea centrală a LPS ("miezul" R) are o variabilitate chimică mult mai restrânsă şi conferă specificitate de gen. Oligozaharidul este legat de lipidul A printr-un trizaharid, 2-ceto-3-dezoxioctonat (KDO).

Lipidul A este legat covalent de oligozaharidul regiunii centrale R. La Salmonella, lipidul A este alcătuit din dizaharide de D-glucozamina legate beta 1-6, interconectate la rândul lor prin punţi pirofosforice. Grupările –OH şi $-NH_2$ ale glucozaminei sunt substituite de acizi graşi: lauric, palmitic, miristic.

Tulpinile care formează colonii R sintetizează o endotoxină incompletă, căreia îi lipseşte polizaharidul regiunii externe, iar regiunea centrală are un conţinut scăzut de glucide.

Efectele endotoxinelor LPS

LPS sunt molecule foarte *imunogene*. Anticorpii au specificitate faţă de polizaharidul extern şi precipită LPS, dar nu neutralizează efectele lor toxice. Răspunsul imun este de tip primar, cu sinteză prelungită de IgM, un titru minim de IgG şi se activează chiar în absenţa limfocitelor T, deoarece molecula de LPS este un antigen timo-independent, cu grupări antigenice repetitive.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Endotoxinele sintetizate de variantele coloniale "rugoase" sunt mai puţin imunogene, datorită structurii lor mai simple.

Lipidul A are proprietăţi imunogene, iar anticorpii specifici reacţionează încrucişat cu lipidul A al altor endotoxine, datorită uniformităţii structurii sale.

Antigenul polizaharidic, obţinut prin hidroliză acidă îşi păstrează proprietatea de specificitate, dar nu este imunogen, având proprietatea de haptenă.

Efectele endotoxinei se manifestă atât în stare fizică legată de celulă, cât şi după ce a fost eliberată. Endotoxinele se eliberează prin moartea şi liza celulei sau printr-un proces de înmugurire", care nu afectează viabilitatea acesteia. Din această cauză, cele două stări, *endotoxemia* şi *bacteriemia* pot să coexiste sau să se manifeste în etape distincte ale procesului infecţios. Proprietăţile endotoxice ale celulelor bacteriene, vii sau omorâte sunt aceleaşi cu ale preparatului de endotoxină. În organismul infectat nu este o corelaţie lineară între nivelul bacteriemiei şi endotoxemiei şi respectiv, intensitatea efectelor endotoxice. Capacitatea organismului de a detoxifica este un factor modulator esenţial al manifestărilor endotoxice. Glucocorticoizii au efect protector anti-endotoxic, probabil prin modificarea permeabilitatii capilare.

Endotoxinele nu au rol în colonizarea şi penetrarea suprafeţei mucoase, deoarece lipidul A are o localizare profundă în membrana externă. Tulpinile invazive şi neinvazive de *Salmonella* produc cantităţi similare de endotoxină. Endotoxina are rol în iniţierea infecţiei, probabil prin inducerea unei scăderi tranzitorii a capacităţii de apărare a gazdei, prin întârzierea declanşării unui răspuns inflamator.

Dozele mici de toxină măresc rezistenţa organismului la infecţiile bacteriene şi virale prin stimularea activităţii fagocitare şi respectiv, a producerii de interferon.

Endotoxinele iniţiază calea alternă a activării complementului, dar efectul nu este bacteriocitoliza, deoarece reacţia se produce la distanţa de membrană externă. LPS stimulează răspunsul imun imediat humoral, prin stimularea nespecifică, policlonală a limfocitelor B, iar *in vitro* au efect mitogenic asupra limfocitelor B. LPS au proprietăţi *adjuvante*, deoarece stimulează răspunsul imun specfic faţă de un antigen administrat simultan.

Dozele mari de endotoxine determină o serie de manifestări patologice sistemice, nespecifice:

- *hipertermie* (febră), prin acţiunea lor asupra centrilor termoreglării, chiar după administrarea unor doze minimale;

- *leucopenie* urmată de leucocitoză. Efectul se exercită direct şi rapid asupra leucocitelor. Ele părăsesc patul vascular şi se retrag aproape instantaneu în plămân şi în alte ţesuturi, în proporţie de circa 60%. După circa 4 ore, numărul leucocitelor circulante creşte peste limitele normale. Creşte numărul hematiilor circulante, datorită eliberării în circulaţie a rezervelor celulare din centrele de formare şi depozitare a eritrocitelor;

- *modificări cardiovasculare*: legarea endotoxinei de celulele hepatice sau de alte celule induce eliberarea rapidă a aminelor biogene (histamina, serotonina) şi a peptidelor (bradikinina) din depozitele celulare. Aminele produc o hipertensiune tranzitorie, urmată de hipotensiune severă, hipovolemie şi formarea cheagurilor vasculare de fibrină. Endotoxinele activează sistemul de coagulare sanguină;

- *efecte metabolice*: sistemele enzimatice ale gluconeogenezei şi ale sintezei glicogenului sunt inhibate.

Din punct de vedere clinic, dozele mari de endotoxină produc următoarea secvenţă de modificări: frison, febră, somnolenţă, dispnee, modificări ale dinamicii tranzitului intestinal, diaree sanguinolentă, hiperglicemie incipientă urmată de hipoglicemie, paralizie, comă, moarte. Acest tablou de modificări se succede în circa 24 de ore după injectarea preparatului la animalele sănătoase şi corespunde stării de *şoc endotoxic*, consecinţă a endotoxemiei. Endotoxemia este rezultatul supraîncărcării celulelor cu rol de apărare, ca urmare a revărsării endotoxinelor în circulaţie. Starea de endotoxemie nu este totdeauna urmată de şoc şi moarte. Nu se cunosc cauzele marilor diferenţe de răspuns şi reactivitate, la starea de endotoxemie. Şocul fatal este consecinţa interacţiunii endotoxinei cu sistemul de coagulare a sângelui, pe care îl activează şi îl

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

amplifică. S-a emis ipoteza că instalarea şocului ireversibil este favorizată de absorbţia în sânge a endotoxinelor produse de microbiota intestinală. În mod normal, mecanismele de detoxifiere a organismului sunt eficiente, dar starea de şoc se instalează consecutiv diverselor tulburări funcţionale, care împiedică o reactivitate optimă faţă de infecţia cu bacterii Gram negative.

Relaţia dintre patogenitate şi parazitism

Relaţiile dintre bacteriile patogene şi organismele gazdă sunt foarte variabile. Multe bacterii infecţioase pot să se dezvolte în mediile naturale şi să intre în competiţie cu microorganismele indigene. Alteori însă, bacteriile patogene sunt strict dependente de o gazdă animală pentru perpetuarea lor în natură, dar pot supravieţui perioade relativ lungi în mediile naturale.

Dependenţa absolută de gazdă are mai multe cauze, cea mai probabilă fiind determinată de existenţa unor exigenţe nutriţionale complexe.

Modul de viaţă parazitară implică pierderea funcţiilor ce asigură supravieţuirea în mediile naturale. Evoluţia dependenţei de gazdă tinde spre o adaptare cât mai eficientă a creşterii *in vivo*. Situaţia extremă a acestei adaptări este toleranţa reciprocă ce evoluează în direcţia unei simbioze.

Bacteriile patogene, cel mai bine adaptate sunt cel mai adesea capabile de creştere intracelulară, iar cele oportuniste sau facultativ parazite au o localizare extracelulară. Pe această bază s-au descris trei categorii de bacterii parazite: parazite extracelulare, facultativ intracelulare şi obligat intracelulare.

Bacteriile parazite extracelulare colonizează în mod normal, pielea şi mucoasele, deşi unele specii invadante se pot dezvolta în sânge şi în limfă. Supravieţuirea lor *in vivo* este condiţionată de rezistenţa la fagocitoză. Ele colonizează zone inaccesibile fagocitozei sau sintetizează subtanţe cu acţiune antifagocitară: leucocidine şi polizaharide capsulare.

Leucocidinele sunt factori de virulenţă care omoară fagocitele profesioniste. Au fost descrise la *S. aureus, Str. pyogenes, Ps. aeruginosa*.

Capsula exercită acţiune antifagocitară pe mai multe căi:

- este o barieră fizico-chimică, împiedicând legarea factorilor opsonizanţi pe suprafaţa celulei bacteriene;
- blochează contactul celulei bacteriene cu receptorii fagocitelor;
- are efect chimiotactic negativ.

Bacteriile patogene parazite *facultativ intracelular* se multiplică atât extracelular, dar pot pătrunde şi în celulele gazdei. Unele se multiplică în fagocitele "neprofesioniste" sau în alte tipuri de celule, dar nu şi în macrofage (de exemplu, *Shigella, N. gonnorhoeae*). Altele sunt capabile să se multiplice în fagocitele "profesioniste", dar şi "neprofesionoiste". Ele rezistă atacului enzimelor litice în vacuolele fagosomilor. Rezistenţa bacteriană se datorează şi prezenţei lipopolizaharidelor pe suprafaţa celulei.

Bacteriile parazite *obligat intracelulare* se dezvoltă exclusiv în celulele vii, dar pot supravieţui şi în mediile extracelulare: micobacteriile, *Chlamydia, Rickettsia, Coxiella*.

Mecanisme de supravieţuire a bacteriilor patogene în celula gazdă

Majoritatea bacteriilor, inclusiv multe bacterii patogene, după ce sunt fagocitate de macrofage sau de polimorfonuclearele neutrofile (PMNN) sunt omorâte. Unele bacterii patogene au elaborat strategii, care le permit să supravieţuiască şi să se multiplice în interiorul fagocitelor. *Sh. flexneri, L. monocytogenes* şi rickettsiile dizolvă vacuola iniţială, de origine membranară şi astfel dobândesc acces la citoplasma bogată în subtanţe nutritive. *Salmonella, Mycobacterium* şi *Legionella* evită sau inhibă fuziunea fagosomului cu lizosomii.

Majoritatea bacteriilor patogene internalizate sau fagocitate în vacuole rămân incluse în aceste structuri pe durata vieţii intracelulare. Ele şi-au elaborat strategii pentru anihilarea mecanismelor celulei gazdă destinate să omoare agentul invadant.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Factorii de virulenţă care determină rezistenţa la enzimele lizosomale şi măresc capacitatea de supravieţuire intracelulară sunt:

- învelişul protector la suprafaţa celulei (capsula, LPS);
- enzimele bacteriene care neutralizează radicalii toxici ai O_2 şi enzimele proteolitice care degradează enzimele lizosomale ale gazdei.

Celulele de *Salmonella* sunt fagocitate într-un fagosom spaţios, atât în celulele fagocitare cât şi nefagocitare şi rămân în interiorul vacuolei. Pentru iniţierea multiplicării, ele necesită pH acid.

Micobacteriile patogene şi *Legionella pneunophila* împiedică acidifierea fagosomului sau sunt înglobate de la început într-o veziculă celulară cu pH neutru.

Chlamidiile sunt bacterii intracelulare, ce rămân în vacuola neacidă în tot ciclul intracelular şi evită fuziunea cu lizosomii. Ele se diferenţiază în două forme: una care creşte în celulele infectate şi formează *corpul reticulat* şi o alta infecţioasă – *corpul elementar extracelular*. Vacuola rămâne o structură distinctă faţă de căile de endocitoză şi exocitoză ale celulei, dar se pare că agentul infecţios exportă proteine care sunt încorporate în membrana vacuolei.

Unii agenţi patogeni intracelari părăsesc vezicula de fagocitoză şi trec în citoplasmă, unde se multiplică. Cele mai studiate sunt *L. monocytogenes* şi *Shigella*, dar şi unele specii de *Rickettsia* folosesc aceiaşi strategie. Aceste bacterii degradează membrana veziculară ce înconjoară invadantul, trec în citoplasmă, unde deplasarea este asigurată de componentele citoscheletului. În citoplasmă, agentul patogen nu mai este expus acţiunii enzimelor lizosomale, dar are acces direct la nutrienţi.

După ce este înglobată în celulele fagocitare şi nefagocitare, *L. monocytogenes* scapă din vacuola fagocitară, prin intermediul listeriolizinei O, o hemolizină activată la pH scăzut şi a două tipuri de fosfolipază C. Toate vacuolele care conţin celule de *Listeria* sunt acidificate, dar numai 14% dintre celule scapă, restul fiind omorâte. Celulele libere în citoplasmă determină condensarea actinei, ce deplasează bacteriile în citoplasmă şi probabil chiar în celulele vecine. *Sh. flexneri* utilizează un mecanism similar pentru ieşirea din vacuola fagocitară.

Factorii de virulenţa bacteriană sunt reglaţi permanent. Bacteriile virulente exprimă genele adecvate pentru fiecare mediu celular. Expresia fenotipică a factorilor de virulenţă este coordonată de diferite semnale din mediu: temperatură, concentraţia ionică, osmolaritatea, nivelul Fe, pH, disponibilitatea sursei de carbon, nivelul O_2. Dacă un singur parametru al mediului este nefavorabil, exprimarea factorilor de invazivitate este represată.

Exprimarea factorilor de virulenţa, în afara gazdei, de obicei nu este necesară. Există însă factori la fel de importanţi pentru supravieţuirea bacteriei în mediul extern sau în organismul gazdei. De îndată ce bacteria patogenă întâlneşte gazda sa şi detectează anumiţi parametri biochimici şi fizici (temperatura, pH), se produc ample modificări ale activităţii genelor: este indusă sinteza unei cascade de factori de virulenţă, unele gene sunt activate, iar altele trec în faza de stop. De exemplu, genele pentru expresia invazinelor sunt necesare timpuriu în infecţie, dar sunt represate în interiorul celulei gazdă.

Interacţiunea agenţilor patogeni cu sistemul imunitar

Sistemele de aparare locală a gazdei constituie prima linie de rezistenţă şi sunt în legătură strânsă cu sistemul imunitar humoral. Microorganismele care supravieţuiesc contactului primar cu gazda, activează funcţia imunitară. Sistemul imunitar al mamiferelor este specializat pentru a detecta componentele specifice celulei procariote: LPS şi mucopeptide. Agenţii patogeni şi-au elaborat strategii prin care evită sau previn mecanismele de apărare a gazdei:

- unii agenţi patogeni alterează componentele răspunsului imun al gazdei (celule sau citochine) şi modulează acest răspuns;
- alţii eludează mecanismele de supraveghere ale sistemului imunitar. De exemplu, agenţii patogeni care sunt localizaţi pe suprafeţele mucoase şi în straturile celulare superficiale (coci

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

piogeni Gram pozitivi) leagă proteine ale gazdei pe suprafaţa lor şi astfel îşi maschează antigenele suprafeţei sau alterează proteinele suprafeţei lor pentru a deruta şi a îngreuna detectarea de către efectorii sistemului imunitar. Mulţi agenţi patogeni leagă proteine ale membranei bazale, ca fibronectina şi colagenul. *H. influenzae* şi *N. meningitidis* au receptori pentru proteinele care leagă Fe – transferina şi lactoferina. Deşi se crede că aceste proteine constituie un mecanism prin care bacteriile dobândesc Fe, acestea au rol în mascarea suprafeţei bacteriene. *S. aureus* leagă IgA, prin intermediul proteinelor A şi G, ceea ce conferă protecţie faţă de anticorpii specifici şi faţă de complement;

- agenţii patogeni pot sintetiza o moleculă de suprafaţă ce mimează un component normal al gazdei. De exemplu, *H. pylori* exprimă un component glucidic pe suprafaţa sa, Lewis X, care diminuă raspunsul limfocitelor T faţă de acest antigen, prezent şi pe celulele mucoasei gastrice a indivizilor infectaţi;

- agenţii patogeni produc factori care inhibă legarea anticorpilor şi a complementului pe suprafaţa lor. Patogenii mucoaselor (*H. influenzae*, *Str. pneumoniae*, *E. coli* K_{12}, *N. meningitidis*) produc material capsular protector faţă de liza cu proteinele complementului, faţă de legarea anticorpilor şi faţă de fagocite. Catenele prea lungi de LPS activează cascada complementului la o distanţă prea mare de suprafaţa celulei;

- *Ps. aeruginosa* şi *Str. aureus* produc proteaze ce degradează moleculele gazdei, iar *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *Str. sanguis* secretă o protează ce degradează IgA;

- Unii agenţi patogeni produc enzime care degradează componentele complementului. De exemplu, *Str. pneumoniae* degradează şi inactivează C_3, iar streptococii de grup A şi B au o C_5-convertază ce blochează proprietăţile sale de chemoatractant;

- alţii alterează celulele efectoare ale sistemului imunitar şi diminuă răspunsul imun. De exemplu, *S. aureus* produce superantigene toxice, asociate cu sindromul şocului toxic şi cu liza limfocitelor;

- patogenii oportunişti "pândesc momentul" în care forţele de apărare ale gazdei sunt diminuate.

Variaţia antigenică

Unii agenţi patogeni îşi modifică periodic componentele structurale de suprafaţă: fimbrii, flageli, LPS, straturi S, proteine ale membranei externe, precum şi câteva proteine secretate.

La bacteriile patogene cu localizare intracelulară, variaţia antigenică este mai restrânsă.

Speciile de *Neisseria* îşi modifică permanent structurile de suprafaţă prin mecanisme genetice. Cea mai variabilă structură, din punct de vedere biochimic este *fimbria*. Numărul genelor care codifică proteinele fimbriale este de peste 50, dar la un moment dat este exprimată una singură. Pe măsură ce celulele bacteriene cresc *in vivo* (în uretră) sau *in vitro*, tipul antigenic al fimbrilinei se modifică prin mecanisme genetice. Printr-un proces de recombinare – via Rec A, gena exprimată este înlocuită cu o copie a altei gene şi se sintetizează o moleculă de fimbrilină cu o nouă specificitate antigenică.

Variaţia antigenică are loc la o specie de *Borrelia* (*B. hermsii*) ce produce febra recurentă. Aceste organisme poartă plasmide lineare care conţin copii multiple ale genelor ce codifică proteinele variabile majore.

Microorganismele oportuniste

Sub această denumire sunt reunite bacterii, microfungi, protozoare care produc infecţii la gazde compromise sub raportul capacităţii de apărare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Conceptul de "microorganism oportunist" este ambiguu, deoarece definiția nu exclude producerea infecției la o gazdă, ale cărei capacități de apărare sunt depășite de doza infectantă sau de virulența crescută a microorganismelor.

După von Graevenitz (1977) microorganismele oportuniste pot produce trei tipuri de infecții:

- unele produc infecții exclusiv la gazdele compromise imunologic (*Mycobacterium avium, Corynebacterium equi*);
- altele produc infecții cu o frecvență mai mare la gazdele imuno-compromise (*Staphylococcus, Salmonella*):
- cele care produc infecții mai severe la gazdele imuno-compromise (*Mycoplasma pneumoniae, Salmonella).*

Microorganismele care produc infecția clinică numai la gazde neimunizate (de exemplu, *Corynebacterium diphteriae*) nu sunt oportuniste.

Microorganismele oportuniste formează o categorie distinctă de a celor saprobionte. Cele saprobionte trăiesc pe materia organică în descompunere și nu intră în competiție cu microbiota normală a organismului. Cele oportuniste pot fi saprobionte, nu fac parte din microbiota normală, dar intră în competiție cu microbiota normală a organismului. Unii membrii ai acesteia pot să producă infecții oportuniste.

Pentru ca un agent sa fie încadrat în categoria microorganismelor oportuniste, von Graenevitz ia în considerație următoarele condiții:

- microorganismul să fie izolat de mai multe ori din leziuni clinice, de la gazde cu deficit al funcției imunitare;
- să fie mai frecvent prezent și izolat de la gazde compromise imunologic, decât de la restul populației;
- prezența sa într-un proces patologic să nu se datoreze unor cauze indirecte.

Condițiile de apariție a procesului infecțios

Simpla prezență a unui microorganism patogen în mediul înconjurator nu este suficientă pentru a produce o infecție la o gazdă sensibilă. Pentru inițierea procesului infecțios sunt necesare următoarele condiții obligatorii: existența unui *izvor de infecție*, a unei *căi de eliminare* a agentului infecțios, a unei *căi de transmitere* și a unei *porți adecvate de intrare* în organismul sensibil. Domeniul specializat al patologiei infecțioase care studiază căile de eliminare, transmitere și pătrundere a agenților patogeni în organism se numește *epidemiologie*.

a) *Izvorul de infecție*

Necesitatea existenței izvorului de infecție derivă din faptul că mediul extern (sol, apă, aer) este nefavorabil creșterii și multiplicării majorității agenților patogeni. Mediul extern asigură, cel mult, condiții de supraviețuire temporară a microorganismelor și de păstrare a infecțiozității virusurilor. Perpetuarea microorganismelor patogene în natură este condiționată de existența unui izvor sau rezervor de infecție, în care agentul patogen se multiplică. Aici se realizează procesul de acumulare naturală, de unde agentul patogen se disemineză și contaminează alte organisme.

Izvorul de infecție este diferit, în funcție de agentul patogen și de spectrul său de gazdă. Unele microorganisme și virusuri infectează numai gazdele animale și produc *zoonoze*, omul fiind infectat în situații accidentale. Alteori, agenții patogeni produc boli infecțioase (transmisibile) strict caracteristice omului (denumite *antroponoze*) fără să infecteze organisme animale. În acest caz, omul reprezintă unicul izvor de infecție în natură, pentru viroze (ca de exemplu, variola, varicela, oreionul, poliomielita, guturaiul, gripa, hepatite) sau pentru bacterioze (ca de exemplu dizenteria bacteriană, febra tifoidă, febrele paratifoide, tusea convulsivă, sifilisul, gonoreea,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

lepra). Pentru unele maladii infecţioase (lepra, sifilisul, variola, rujeola), omul bolnav este unicul rezervor natural al infecţiei. În alte cazuri (de exemplu, febra tifoidă, scarlatina, difteria, poliomielita, holera), agentul infecţios este transmis atât de omul bolnav, cât şi de cel sănătos, *purtător* de agenţi patogeni. În unele cazuri, purtătorii sunt foştii bolnavi care s-au imunizat, nu mai prezintă nici un simptom clinic, dar păstrează în organism agentul patogen, temporar sau pentru totdeauna, pe care îl elimină în mediu. Purtătorii sunt foarte importanţi pentru diseminarea agenţilor patogeni în mediul extern, deoarece fiind aparent sănătoşi sunt greu de depistat şi se deplasează liber în colectivităţi, unde pot transmite infecţia la organismele receptive.

O altă categorie de boli infecţioase sunt comune omului şi animalelor şi sunt cunoscute sub denumirea generică de *antropozoonoze*. Izvorul de infecţie este reprezentat ce animale domestice sau sălbatice: câinele pentru rabie, febra butonoasă, leptospiroze; bovinele pentru salmoneloze, vaccina, bruceloza, tuberculoza, febra Q; şobolanul pentru salmoneloze, leptospiroze, febra muşcăturii de şobolan (febra sodoku), turbare, pestă (ciumă), tifos murin; păsările pentru encefalite virale, ornitoze, salmoneloze etc.

Controlul antropozoonozelor este foarte greu pentru că în circuitul agentului patogen intră animalele sălbatice. De exemplu, turbarea este răspândită la vulpe, veveriţă, liliac, de unde este transmisă la câine, iar de câine la om. Chiar dacă incidenţa bolii scade după imunizarea câinilor prin vaccinare, virusul nu se poate elimina din populaţiile de animale sălbatice.

Unele microorganisme patogene se dezvoltă, în primul rând în mediile naturale (apă, sol) şi numai accidental infectează gazdele: de exemplu, agenţii tetanosului şi ai gangrenei gazoase. Agenţii se multiplică în sol şi pentru a se menţine nu este necesară transmiterea la o gazdă. *Clostridium botulinum*, agentul botulismului se dezvoltă numai în sol, de unde ajunge în conservele alimentare, se multiplică şi produce toxina, care după ingestie produce manifestări patologice.

b) *Căile de eliminare a agenţilor patogeni*

Agenţii patogeni care se multiplică în izvorul natural de infecţie sunt eliminaţi în mediu şi pot să infecteze gazde noi. Calea de eliminare este condiţionată de localizarea lor specifică în organism. Principalele căi de eliminare a agenţilor patogeni sunt calea intestinală şi cea respiratorie.

Calea *intestinală* este comună bacteriilor enterotrope, prin intermediul materiilor fecale, care pot conţine intermitent sau continuu, cantităţi mari de agenţi patogeni ai febrelor tifoide şi paratifoide, dizenteriei, holerei, ai toxiinfecţiilor alimentare, precum şi virusuri (virusul hepatitei A, virusul polio).

Calea *respiratorie* asigură răspândirea agenţilor patogeni ai infecţiilor respiratorii (difteria, tusea convulsivă, rujeola, variola, varicela, oreionul, gripa, guturaiul), prin intermediul secreţiilor nazofaringiene şi bucale, proiectate în timpul tusei, strănutului, vorbirii. Pe această cale, omul bolnav sau infectat răspândeşte în jur o pulbere fină de aerosoli constituiţi din picături microscopice de secreţii încărcate cu agenţi patogeni. Într-un strănut se pot elimina între 10 000 – 100 000 celule bacteriene. Cele rezistente la uscăciune îşi păstrează viabilitatea pentru perioade lungi de timp, ataşate de particulele inerte.

Alte căi de eliminare: răni şi supuraţii (în cazul infecţiilor produse de stafilococi, streptococi, bacilul piocianic, gangrena gazoasă); calea urinară (pentru agenţii febrei tifoide, leptospirozei, febrei Q, tuberculozei renale); secreţia lactată (agentul brucelozei, tuberculozei, febrei Q).

Pentru agenţii patogeni care produc infecţii generalizate şi care nu au o cale naturală de eliminare din organism, ieşirea se realizează prin intermediul unui artropod hematofag care se hrăneşte cu sângele infectat (de exemplu, agenţii tifosului exantematic, ai pestei, ai encefalitelor virale, ai paludismului) sau ieşirea se face pe cale artificială, prin seringa sau instrumente chirurgicale infectate (agenţii hepatitelor virale B, C, D, ai sifilisului).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

c) *Calea de transmitere a agenţilor infecţioşi*

După ce au fost eliminate din organismul bolnav sau purtător, agenţii patogeni trebuie să fie transmişi la o nouă gazdă receptivă. Transmiterea se realizează în mai multe modalităţi.

Transmiterea prin *contact direct* are loc în cazul în care, între organismul infectat şi cel receptor există o legătură directă şi se face prin *muşcătură* (agentul turbării, al febrei muşcăturii de şobolan), prin *supt* (la animale, agenţii febrei Q, tuberculozei, iar la om, *M. tuberculosis*, agenţii infecţiilor piogene), prin *sărut*(agenţii tuberculozei pulmonare, sifilisului, mononucleozei infecţioase), prin contact *cutanat* direct(agenţii dermatomicozelor, furunculozei), prin contact *sexual* (agenţii sifilisului, gonoreii). Când agentul cauzal este transmis prin căile genitale, infecţia se numeşte *venerică*.

De cele mai multe ori, transmiterea infecţiei este *indirectă*, prin interpunerea mai mult sau mai puţin evidentă, a unui factor de mediu neanimat denumit *vehicul*, sau a unui organism denumit *vector*, care se interpune între izvorul de infecţie şi organismul receptor:

- transmiterea prin intermediul produselor alimentare – carne, lapte, ouă, în cazul în care provin de la animale infectate sau sunt contaminate prin manipulare de către o persoană (bolnavă sau purtătoare) care elimină agenţi patogeni. Bacteriile patogene, de regulă se multiplică în produsele alimentare. Astfel se transmit agenţii febrei tifoide, ai toxiinfecţiilor alimentare (cu *Staphylococcus* şi *Salmonella*), ai febrei Q, ai infecţiei carbunoase, ai botulismului, ai tuberculozei;

- transmiterea prin intermediul obiectelor folosite de un bolnav (vesela, rufe, îmbrăcăminte, cărţi, jucării etc) este posibilă un timp limitat după contaminarea acestora, proporţional cu rezistenţa agenţilor patogeni la condiţiile de mediu (agenţii tuberculozei, difteriei, scarlatinei, variolei);

- transmiterea prin vectori se realizează prin intermediul artropodelor, în special hematofage (insecte, căpuşe), care preiau agenţii patogeni de la gazdă infectată şi îi transmit la o nouă gazdă, fie prin înţepătură, fie depunându-i pe tegumentul intact sau lezat. Uneori, vectorul are numai *rol mecanic* pentru agentul patogen, pe care îl transportă în tubul digestiv sau pe suprafaţa corpului. Musca este vectorul mecanic pentru agentul patogen al febrei tifoide, al dizenteriei. Alteori, vectorul este el însuşi infectat şi realizează o *transmitere biologică*. În acest caz, agentul patogen se multiplică masiv în corpul vectorului (de exemplu, *Ricketsia prowazeki*, agentul tifosului exantematic) sau străbate o fază a ciclului său vital (de exemplu, sporozoidul *Plasmodium*, în corpul ţânţarului). Flavivirusurile (agenţii encefalitelor) se multiplică în organismul artropodelor vectoare, fără să producă leziuni tisulare;

- transmiterea prin intermediul aerului se face prin inhalarea picăturilor septice, răspândite de un bolnav sau de un purtător de agenţi patogeni. Cele mai eficiente sunt picăturile septice foarte mici (nuclei), care pot rămâne în suspensie, în aer (ca aerosoli), mult timp după eliminarea lor din organism. Astfel se transmit agenţii gripei, guturaiului, rujeolei, rubeolei, varicelei, scarlatinei, tusei convulsive;

- transmiterea hidrică este proprie infecţiilor intestinale (agenţii febrelor tifoidă şi paratifidă, holerei hepatitei A, enterovirozelor) şi leptospirozelor şi se produc prin contaminarea accidentală a unei surse de aprovizionare cu apă, cu agenţii patogeni proveniţi din dejecţii umane sau animale;

- transmiterea prin intermediul solului are loc în cazul unor plăgi, de regulă adânci, în care au fost antrenate granule de sol. Astfel se transmit infecţiile cu *B. anthracis*, cu *Cl. tetani*, agenţii gangrenei gazoase (*Welchia perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum*).

d) *Poarta de intrare în organism*

Pentru ca agenţii patogeni să determine o boală infecţioasă este necesar ca ei să învingă barierele naturale protectoare ale gazdei. Poarta de intrare în organism corespunde, în general, căii prin care s-a făcut eliminarea agentului patogen din organismul infectat.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

De cele mai multe ori, poarta de intrare în organism este reprezentată de *calea respiratorie* (în infecţii ca oreionul, guturaiul, gripa, rujeola, variola, varicela, difteria, tusea convulsivă, scarlatina), *calea digestivă*(agenţii febrei Q, hepatitei virale A, poliomielitei), *calea cutanată*(pentru agenţii infecţiei cărbunoase, tularemiei, febrei Q, pentru agenţii transmişi prin muşcătură, prin înţepătura vectorilor, prin rănire).

Unii agenţi patogeni pătrund în organismul receptiv pe mai multe căi, din care una este principală, dar determină aceleaşi manifestări indiferent de poarta de intrare. Alţi agenţi produc maladii cu caractere clinice diferite, în funcţie de poarta de intrare, ca *unic factor determinant* şi fără relaţie cu vreun caracter biologic particular al agentului patogen. De exemplu, *B. anthracis*, după pătrunderea pe cale tegumentară, produce cărbunele cutanat, iar după ingestia alimentelor contaminate, produce un proces patologic intestinal. Dacă infecţia se face pe cale respiratorie, rezultatul este infecţia pulmonară.

Infecţia. Tipuri de infecţii

Infecţia reprezintă totalitatea proceselor biologice care se desfăşoară în organismul uman sau animal, ca urmare a pătrunderii şi multiplicării agenţilor patogeni.

Pentru iniţierea procesului infecţios, agentul patogen trebuie să pătrundă în organism pe o cale adecvată, iar organismul să fie receptiv (să permită multiplicarea agentului infecţios). În concepţia modernă, procesul infecţios trebuie interpretat ca rezultat al interacţiunii dinamice dintre micro- şi macroorganism. În concepţia ecologică, agentul infecţios este forţa motrice a procesului infecţios, iar reactivitatea imunitară a organismului condiţionează intensitatea, extinderea, gravitatea şi însăşi posibilitatea apariţiei procesului infecţios.

În raport cu momentul în care se face infecţia organismului uman şi animal se disting patru tipuri de infecţii.

a) Infecţia *germinală* se produce în cazurile în care ovulul sau spermatozoidul sunt purtătorii agentului infecţios, pe care-l transmit celulei-ou (pe verticală), odată cu caracterele ereditare. Acest mecanism de infecţie nu s-a demonstrat la om şi nici la animalele superioare. A fost descris la artropode (căpuşe din g. *Ornithodorus, Dermacentor, Rhipicephalus*), infectate astfel cu bacteria spiralată *Borrelia recurentis*, agentul patogen al febrei recurente de căpuşe. Ele devin astfel, rezervoare naturale de infecţie.

b) Infecţia *transplacentară* (intrauterină) este demonstrată şi la om. Uneori este condiţionată de producerea prealabilă a unor leziuni placentare sub acţiunea agentului patogen, ca de exemplu, *T. pallidum, Brucella, Coxiella burnetii* (agentul febrei Q). Alteori, infecţia are loc fără modificări placentare (infecţia variolică, rujeolică, hepatică etc.).

c) Infecţia *intrapartum* se produce în timp ce fătul traversează căile genitale (la expulzie), cu microorganisme patogene ale tractului genital matern (oftalmia şi conjunctivita gonococică a noilor născuţi).

d) Infecţia *postpartum* se produce după naştere. În această categorie sunt cuprinse majoritatea infecţiilor omului şi animalelor. Ele se manifestă în special după epuizarea imunităţii pasive, conferită de transferul anticorpilor materni prin placentă şi colostru.

În raport cu originea microorganismelor care le produc, infecţiile sunt de două categorii:

- *exogene*, provocate de microorganisme care pătrund pe o cale adecvată;
- *endogene*, provocate de microorganisme autohtone (indigene), potenţial patogene ale microbiotei normale, datorită scăderii rezistenţei locale sau generale a gazdei, după iradiere, după tratamentul cu medicamente citotoxice, hormoni corticosteroizi, malnutriţie, obstrucţia căilor de excreţie. Aceste infecţii nu induc un răspuns imun detectabil şi au tendinţa să revină ciclic sau să evolueze lent.

Din punct de vedere microbiologic, starea caracteristică a organismului infectat cu un agent patogen, înainte de declanşarea simptomelor este aceea de *contaminare*.

Colonizarea sau multiplicarea are loc după pătrunderea agentului infecţios pe o cale adecvată. Multiplicarea realizează condiţia cantitativă obligatorie a procesului infecţios,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

deoarece, în mod obişnuit, doza contaminantă a agentului patogen este prea mică pentru a iniţia imediat procesul infecţios. Cu cât tulpina este mai virulentă, cu atât doza contaminantă necesară iniţierii infecţiei este mai mică.

După contaminare, agentul patogen se multiplică la poarta de intrare sau este transporat prin sânge şi limfă, la nivelul unor situsuri specifice localizate la distanţă.

Consecinţa directă a colonizării (multiplicării) agentului patogen la poarta de intrare, local se constituie un *focar de inflamaţie*, adică o reacţie de apărare locală a organismului, cu mobilizarea şi aglomerarea leucocitelor. Rezultatul inflamaţiei este *supuraţia* (formarea puroiului), la nivel cutanat şi la nivelul mucoaselor respiratorie, digestivă, urinară, genitală.

Modalităţile de manifestare a patologiei infecţioase

În funcţie de natura agentului patogen, de preponderenţa unuia sau altuia dintre factorii de virulenţă, patologia infecţioasă îmbracă următoarele aspecte:

a) *Intoxicaţia* de natură bacteriană fără infecţie, este o situaţie de excepţie, în cazul botulismului. *Cl. botulinum* se multiplică în alimentele conservate şi produce toxina. Consumul unor astfel de alimente determină intoxicaţia;

b) *Toxiinfecţiile* sunt procese alterative produse de bacteriile care se multiplică la poarta de intrare şi eliberează toxine difuzibile în organism. De exemplu, *Cl. tetani* se multiplică în plaga anaerobă provocată de rănire, iar toxina ajunge prin difuzie axonală retrogradă, la motoneuronii din coloanele anterioare ale măduvei, unde îşi exercită efectul. Asemănător, *C. diphteriae* se multiplică la nivelul mucoasei faringiene, iar toxina determină efecte patologice la distanţă, asupra fibrei musculare cardiace, celulei nervoase sau glandelor suprarenale;

c) *Toxiinfecţiile alimentare* sunt rezultatul consumului alimentelor infectate (carne, lapte, ouă) provenite de la animalele bolnave sau contaminate în timpul manipulării. De exemplu, *Salmonella* sp. şi *Str. aureus* se multiplică excesiv în alimente (carne) şi concomitent se acumulează endotoxine şi respectiv enterotoxine. Consumul alimentelor echivalează cu ingestia culturii bacteriene. Concomitent cu efectele toxinelor se manifestă şi procesul infecţios iniţiat de celulele vii ingerate;

d) *Infecţia localizată* (neinvazivă) este produsă de agenţii patogeni care de obicei rămân localizaţi la poarta de intrare în cursul întregului proces infecţios. Toxinele eventual sintetizate, se răspândesc sistemic, pe cale sanguină (de exemplu, *C. diphteriae, Cl. tetani*). În aceste cazuri, infecţia locală are caracterul unei toxiinfecţii. O formă particulară a infecţiei locale este infecţia de focar. Aceasta este însoţită de o reacţie inflamatorie minimă la nivelul focarului iniţial, dar se exprimă prin fenomene morbide la distanţă. Maladia reumatismală este considerată ca o infecţie tipică "de focar", în timpul căreia streptococul localizat la poarta de intrare (amigdale) elimină subtanţe cu efect alterativ şi alergizant. Uneori, infecţia localizată este o caracteristică a microorganismelor lipsite de invazivitate

e) *Infecţiile invazive* sunt produse de agenţii infecţioşi care, după o perioadă iniţială de multiplicare la poarta de intrare, se răspândesc la distanţă pe diferite căi:

- prin *contiguitate*, tipică agenţilor infecţioşi cu multiplicare intracelulară (virusuri, rickettsii). După eliberare prin necroza celulei, prin înmugurire, prin permeabilizarea sau ruperea membranei, agenţii infecţioşi infectează celulele sensibile învecinate;

- prin *continuitate*, în cazul agenţilor patogeni care se multiplică într-un ţesut prevăzut cu un sistem canalicular. Diseminarea se face din aproape în aproape. Astfel, infecţiile respiratorii progresează spre bronhii (bronşite), ţesutul pulmonar (pneumonii), pleure (pleurite). De la nivelul apendicelui, agentul diseminat produce peritonita. La nivelul căilor urogenitale şi biliare, agentul infecţios întâlneşte o rezistenţă minimă conferită de scurgerea secreţiilor şi de unele manifestări de mobilitate locală, orientate în sens opus progresiei infecţiei;

- *pe cale limfatică*. De la nivelul focarului infecţios primar, agenţii infecţioşi sunt preluaţi de curentul limfatic. Consecinţa imediată este inflamarea vaselor limfatice şi a ganglionilor regionali (limfadenita). Infecţia poate să progreseze prin vărsarea limfei în sânge şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

rezultatul este *bacteriemia* sau *viremia*. Agenţii infecţioşi pot trece direct în sânge, la nivelul leziunilor pereţilor vasculari.

Bacteriemia semnifică prezenţa unui număr mic de bacterii în torentul circulator, pentru o perioadă strict limitată de timp. Sistemele de apărare, în special sistemul fagocitar elimină bacteriile circulante. Bacteriemia este consecinţa proceselor infecţioase acute pulmonare, intervenţiilor chirurgicale, extracţiei dentare, absorbţiei intestinale şi chiar periajului dentar. În sânge, cu rare excepţii (bacilul carbunos, al pestei) bacteriile nu se multiplică. De aceea, prezenţa lor în sânge semnifică o eliberare dintr-un focar de infecţie, atât de abundentă, încât, temporar, depăşeşte capacitatea protectoare a mecanismelor de apărare a organismului.

Extinderea infecţiei pe una din căile menţionate poate determina fie o infecţie *regională*, care corespunde extinderii infecţiei (diseminării) pe teritorii întinse (de exemplu, sistemul limfatic regional şi eventual vasele sanguine tributare zonei), fie o infecţie *generalizată*.

Dintr-o infecţie regională, agenţii patogeni diseminaţi pe o cale adecvată pot dobândi localizări secundare, în orice ţesut sau organ, unde iniţiază noi focare infecţioase. Aceste localizări pot fi unice (de exemplu, pe valvulele cardiace, în plămâni, meninge, ficat, vezica biliară, creier, rinichi etc.) sau multiple (miliare) denumite *septicopioemii*, care evoluează spre *infecţii generalizate*.

Diseminarea sanguină determină infecţii generalizate. Ele sunt precedate de trecerea masivă a bacteriilor dintr-un focar infecţios, în sânge şi semnifică incapacitatea mecanismelor de apărare a gazdei de a reacţiona eficient faţă de agentul infecţios. Existenţa stabilă a unui număr mare de bacterii în sânge caracterizează *infecţia septicemică*. Septicemia este consecinţa descărcării masive de bacterii dintr-un focar de infecţie, vascularizat. Starea septicemică poate fi însoţită de toxemie, ca urmare a difuziei toxinelor din focar (abces, meningită).

Uneori, faza septicemică nu este precedată de multiplicarea agentului patogen la poarta de intrare. Agenţii patogeni ai infecţiilor transmise de insectele hematofage (tifos exantematic, febra recurentă) sau prin muşcătură (leptospiroze) străbat mucoasele şi trec direct în sânge.

Infecţia bacteriană produce modificări de tip alterativ ale organismului gazdă. Ele sunt *primare* (directe), datorate factorilor de patogenitate bacteriană (intoxicaţii, toxiinfecţii, bacteriemii) şi *secundare*, mediate de factorii umorali şi celulari ai sistemului imunitar (stările de hipersensibilitate).

Posibilităţi de evoluţie în procesului infecţios

Infecţia poate evolua în două modalităţi: *inaparent* sau *aparent*, ca boală infecţioasă.

Infecţia *inaparentă* caracterizează acele situaţii în care, procesul infecţios nu se exteriorizează prin simptomatologie clinică. De exemplu, infecţia tuberculoasă inaparentă se detectează prin reacţia de hipersensibilitate întârziată la tuberculină. Reacţia este pozitivă la un procent mare de indivizi, dar maladia tuberculoasă clinică se manifestă la un procent mic din totalul persoanelor pozitive pentru testul tuberculinei. De cele mai multe ori, infecţiile inaparente se detectează prin reacţii serologice *in vitro* sau prin reacţii de hipersensibilitate *in vivo*.

Uneori, infecţia asimptomatică poate fi mortală. Explicaţia constă în paralizia mecanismelor de apărare a gazdei.

Infecţia *aparentă* este cea care se manifestă printr-un ansamblu de semne clinice obiective şi subiective, specifice şi nespecifice, consecinţe ale alterărilor produse de agentul infecţios şi de produsele activităţii sale.

Maladia infecţioasă prezintă următoarele caracteristici; a) este produsă de microorganisme vii sau de toxine ale microorganismelor; b) poate realiza o imunitate specifică de durată variabilă; c) organismul bolnav poate deveni sursa de îmbolnăvire a indivizilor sănătoşi; d) este specifică, în sensul că aceiaşi maladie este produsă totdeauna de acelaşi agent cauzal, deşi clinic se poate prezenta sub aspecte variate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Etapele maladiei infectioase

În evoluţia sa, procesul infecţios aparent parcurge mai multe etape distincte, separate în timp.

Perioada de incubaţie sau perioada iniţială este intervalul de timp scurs între momentul pătrunderii agentului patogen în organism şi acela al debutului maladiei. Perioada este lipsită de simptome clinice evidente. Durata ei este variabilă, în funcţie de natura agentului patogen, iar pentru acelaşi agent, în raport cu doza infectantă, cu virulenţa agentului patogen şi cu reactivitatea imunitară a gazdei şi se măsoară în zile, săptămâni, luni sau este foarte scurtă. Pentru infecţiile *exogene*, durata incubaţiei se poate determina relativ precis, prin infecţia experimentală a animalelor de laborator sau a voluntarilor. Pentru infecţiile *endogene*, perioada de incubaţie nu se poate determina. Din momentul contaminării este posibilă scurgerea unei perioade foarte lungi de timp până când microorganismul poate să iniţieze un proces infecţios. În această perioadă, agentul patogen se multiplică, se localizează la nivelul situsului receptiv şi eventual elaborează substanţe toxice.

Cel mai adesea, agenţii infecţioşi manifestă un organotropism evident, legat de faptul că, în general, fiecare specie îşi găseşte condiţiile optime de dezvoltare într-un anumit ţesut. De exemplu, indiferent de calea de pătrundere, vibrionul holeric se localizează în intestinul subţire, bacilul dizenteric – în mucoasa intestinului gros, *Brucella* – în placenta bovinelor şi ovinelor, datorită concentraţiei mari de eritrol (dar nu în placenta umană), *Rickettsia prowazeki* – în celulele epiteliale ale capilarelor SNC, *B. pertusis* – exclusiv în mucoasa bronşică.

B. anthracis se multiplică în orice ţesut, chiar şi în sânge.

Debutul bolii este marcat de momentul în care numărul de agenţi infecţioşi şi cantitatea de toxine acumulate au atins un nivel critic. Debutul poate fi brusc sau lent şi este caracterizat din punct de vedere clinic, prin instalarea (bruscă sau gradată) a semnelor bolii: febră, cefalee, frisoane, algii musculo-articulare. Debutul marchează începutul perioadei de invazie a agentului infecţios de la locul multiplicării primare sau a eliberarii unei cantităţi prag de toxină, spre noi zone sensibile, iar din punct de vedere cronologic şi clinic semnifică începutul *perioadei de stare*.

Perioada de stare este intervalul de timp, în care maladiile infecto-contagioase îşi desfăşoară un tablou clinic cu simptome caracteristice, de amplitudinea, decisivă pentru evoluţia ulterioară. În această perioadă poate să survină decesul.

La sfârşitul perioadei de stare, simptomele dispar brusc – *in crisis* (de exemplu, în pneumonia bacteriană), însoţită de sterilizarea bacteriologică sau lent – *in lysis* (in cazul febrei tifoide). Organismul se poate steriliza sau poate să rămână infectat pentru o perioadă nedefinită de timp.

În perioada de stare, organismul se imunizează abundent cu antigene ale agentului patogen şi se sintetizează anticorpi. Imunizarea are ca rezultat, de regulă, sterilizarea bacteriologică sau virologică a organismului. Uneori, organismul nu se sterilizează şi în focarele de infecţie greu accesibile efectorilor raspunsului imun, agentul persistă, consecinţa fiind o *infecţie cronică*.

Convalescenţa este perioada de timp în care organismul îşi reface potenţialul de activitate, anterior îmbolnăvirii.

Infecţia cronică corespunde unei stări de echilibru între agentul infecţios şi organismul gazdă, caracterizată prin faptul că vindecarea clinică (dispariţia simptomelor) nu este însoţită de sterilizarea organismului. Focarele de infecţie cronică au localizari greu accesibile factorilor de apărare a organismului sau medicaţiei: în SNC, în viscerele parechimatoase (ficat, rinichi, splină), în sinusurile osoase, în glandele bine încapsulate (prostata). Infecţia cronică poate să persiste fără simptome clinice (sifilisul latent) sau poate evolua cu reacutizări intermitente la diferite perioade (bruceloza, tuberculoza, sifilisul teţiar).

Starea de purtător este, fie consecinţa unei infecţii cronice, fie a persistenţei pentru o perioadă de timp, a unui focar de infecţie, în organismele clinic sănătoase. Uneori, foştii bolnavi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

tolerează la nivelul mucoaselor, agentul patogen pe care îl elimină timp de câteva săptămâni (*Str. pyogenes, C. diphteriae, V. cholerae*). Alteori, bacteriile şi virusurile sunt eliminate pentru perioade îndelungate (de ordinul anilor): S. *typhimurium* rămâne localizată în vezica biliară, de unde se elimină intermitent, iar bolnavii de difterie pot rămâne purtători ai bacilului *C. diphteriae*. Purtătorii creează probleme dificile din punct de vedere epidemiologic, deoarece reprezintă izvoare de infecţie greu de depistat. Purtătorii sunt foarte periculoşi pentru sănătatea publică, mai ales dacă vin în contact cu alimentele, ca manipulatori sau preparatori ai acestora.

Tipuri de evoluţie epidemiologică a infecţiei

Din punct de vedere epidemiologic, maladia infecţioasă poate evolua pe mai multe nivele de extindere spaţio-temporală şi incidentală:

- *evoluţia sporadică* semnifică apariţia cazurilor izolate de îmbolnăvire, atât în timp cât şi în spaţiu;
- *evoluţia endemică* este definită prin apariţia cazurilor relativ rare de infecţie, care se menţin numeric constante într-o colectivitate şi apar cu relativă regularitate, de obicei sezonier, la intervale variabile de timp. Majoritatea indivizilor populaţiei sunt imunizaţi şi deci indemni faţă de agentul infecţios;
- *evoluţia epidemică*, caracterizează evoluţia rapidă a unei infecţii într-un interval scurt de timp, cu un număr mare de cazuri clinice într-o colectivitate (cămin, cazarmă, sat, regiune, ţară). Se cunosc epidemiile de ciumă, gripă, rujeolă, scarlatină;
- *evoluţia pandemică* este aceea în care maladia infecţioasă se extinde foarte rapid pe un teritoriu foarte larg (ţări, continente), cu un număr foarte mare de cazuri clinice. Este caracteristică infecţiei gripale şi este uşurată de mijloacele de deplasare rapidă, la distanţe foarte mari.

Faţă de un agent patogen, absent în mod obişnuit dintr-un areal, populaţia poate fi foarte susceptibilă. La primul contact cu populaţia receptivă, agentul patogen declanşează o epidemie explozivă, dar odată cu instalarea stării de imunitate specifică, incidenţa maladiei scade.

Dacă agentul patogen îşi modifică specificitatea antigenică, epidemia evoluează şi într-o populaţie imunizată, deoarece, faţă de noile variante antigenice, populaţia nu posedă anticorpi specifici.

Epidemiile sunt condiţionate de standardul de viaţă al comunităţii. Maladia tuberculoasă este o reflectare a acestei condiţii, în timp ce bolile venerice sunt favorizate de promiscuitatea sexuală.

D. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN CIRCUITUL GLOBAL AL MATERIEI ÎN NATURĂ

Organismele fototrofe (plante, alge, bacterii fotosintetizante) sintetizează subtanţe organice, pornind de la CO_2, apă şi săruri minerale, utilizând energia solară pe care o transformă în energie chimică.

Unele subtanţe minerale au un rol biologic primordial (C, N, O, H, S, P, Na, K, Fe), iar altele sunt necesare numai în cantităţi foarte mici (Mn, Mg, Zn, Cu, Co, Mo, B, etc.).

Biomasa produsă în fotosinteză este preluată parţial de către organismele heterotrofe. Resturile organice vegetale şi animale se reântorc în sol şi ape, dar sunt neutilizabile de către plante. Solul pierde astfel permanent substanţe anorganice prin încorporarea lor în substanţă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

organică. Se adaugă pierderile determinate de eroziune, de depunerea unor compuşi minerali în sedimente şi roci sedimentare sau stocate sub forme ce evoluează spre stadiul de combustibili fosili (cărbune, ţiţei). Continuarea acestui proces ar produce în timp, epuizarea formelor utilizabile, situaţie incompatibilă cu existenţa vieţii. Fenomenul epuizării este împiedicat de faptul că microorganismele din sol şi ape desfăşoară permanent o puternică acţiune de mineralizare a substanţelor organice de provenienţă vegetală sau animală.

Ciclurile *biogeochimice* însumează căile de circulaţie a elementelor biogene în natură, prin care trec de la forma anorganică, la forma organică, pentru a reveni la forma anorganică din compartimentul abiotic. În ciclul biogeochimic intră în acţiune reacţii fizice (solubilizare, precipitare, volatilizare) şi chimice (oxidări, reduceri, hidrolize), precum şi activităţi biologice (degradări şi mineralizări, conversie organică prin biosinteze).

Ciclurile diferitelor elemente biogene sunt strâns interconectate şi interdependente, realizând în ansamblu, ciclul global al materiei în natură. De exemplu, bacteriile proteolitice, care descompun proteinele la CO_2, NH_3 şi H_2S sunt implicate în trei cicluri: al C, N şi S.

Influenţa omului perturbă capacitatea proprie de echilibrare a unui ciclu, producând, uneori, modificări severe şi greu reversibile ale mediului: creşterea concentraţiei CO_2 în atmosferă, ca o consecinţă a arderii combustibililor fosili, poluarea sub diferite forme, cu un aport excesiv de materie şi energie.

În circuitul materiei în natură, rolul microorganismelor este esenţial. Fără microorganisme n-ar putea exista plante, iar în lipsa lor, viaţa animalelor ar înceta. Microorganismele sunt tot atât de indispensabile vieţii, ca şi sursa de energie pe care o reprezintă soarele.

CIRCUITUL BIOGEOCHIMIC AL AZOTULUI

Azotul este un element esenţial pentru existenţa vieţii în biosferă, deoarece este inclus în structura tuturor proteinelor şi acizilor nucleici. Deşi reprezintă 79% din conţinutul atmosferei, azotul se găseşte aproape totdeauna în forme inaccesibile plantelor şi animalelor.

Azotul atmosferic, diatomic (N≡N) este un gaz inaccesibil majorităţii sistemelor biologice. Se adaugă cantităţi importante de azot organic din organismele vii şi din humus, precum şi din sedimentele din mări şi oceane.

În circuitul azotului în natură, azotul mineral (NH_4^+, NO_3^-) este înglobat de plante sub forma constituienţilor celulari. Ţesuturile vegetale şi animale moarte sunt mineralizate în procesul de proteoliză şi *amonificare* şi convertite prin *nitrificare*, la forme din nou accesibile plantelor. Pierderile de azot din sol, legate de recoltarea plantelor de cultură, precum şi de *denitrificare* şi levigaţie depăşesc (pentru solurile cultivate) cantitatea de azot accesibil. De aici decurge necesitatea îmbogăţirii solului în azot combinat, fie pe cale naturală prin fixarea biologică a azotului atmosferic, fie artificial, prin adaugare de îngrăşăminte azotate. Se adaugă azotul fixat pe cale abiotică prin iradieri, descărcări electrice din atmosferă şi cel rezultat din procese de combustie (echipamente electrice, motoare cu combustie internă, etc.).

Circuitul biologic al azotului este un proces lent, care se desfăşoară sub acţiunea a peste 100 de genuri de bacterii. Azotul gazos atmosferic este convertit la forme fixe (NH_4^+, NO_3^-, NO_2^-), care sunt folosite de plante şi încorporate sub forme organice în componenţi structurali.

Etapele esenţiale ale circuitului azotului, unele desfăşurate în aerobioză, iar altele în anaerobioză, sunt: *fixarea azotului molecular, amonificarea, nitrificarea* (nitritarea şi nitratarea), *denitrificarea*, toate mediate numai de bacterii.

Fixarea biologică a azotului este realizată în exclusivitate de bacterii chimiotrofe şi fototrofe.

Din numărul total de 260 de genuri de bacterii chemotrofe, circa 10% conţin nitrogenază şi au capacitatea de a fixa N_2. Ele includ specii din genurile: *Alcaligenes, Aquaspirillum,*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Arthrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Beijerinckia, Campylobacter, Citrobacter, Clostridium, Derxia, Desulfotomaculum, Desulfovibrio, Enterobacter, Erwinia, Frankia, Klebsiella, Methylobacter, Methylosinus, Methylococcus, Mycobacterium, Propionibacterium, Rhizobium, Thiobacillus, Xanthobacter. Unele *(Rhizobium, Frankia, Azospirillum)* formează simbioze cu diferite grade de specificitate, iar celelalte sunt fixatoare de N_2 libere. Unele sunt aerobe (*Azotobacter, Beijerinckia*, etc.), altele anaerobe (*Clostridium, Desulfovibrio*, etc.), iar celelalte, în majoritate, aerobe facultativ anaerobe (*Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter*).

Mulder şi colab. (1965) consideră că bacteriile fixatoare de N_2 libere au o contribuţie minoră la economia globală a acestui element în natură şi la fertilitatea solului: 2-3 kg N/ha/an.

Din cele 12 genuri de bacterii fototrofe identificate până acum, 92% au capacitatea de a fixa N_2: *Chlorobium, Chromatium, Pelodictyon, Rhodospirillum, Thiocapsa, Thiocystis*, etc. Ele fac fotosinteză anoxigenică şi de aceea importanţa lor este limitată la mediile anoxice, şi anume la sedimentele din lacurile puţin adânci.

Fixarea biologică a azotului în asociaţie cu plantele este rezultatul unei cooperări mai mult sau mai puţin intime cu planta gazdă. În această categorie sunt cuprinse: simbioza *Rhizobium* cu plante leguminoase şi neleguminoase; simbiozele asociative; simbiozele foliare; actinorizele; cianobacteriile simbiotice fixatoare de N_2, în asociaţii cu fungii din clasa *Ascomycetes* sau *Basiomycetes* în licheni; cu muşchii din grupul *Hepaticae*; cu pteridofitele în asociaţia *Azolla-Anabaena azollae*; cu gimnospermele (*Cycas, Ceratozamia*, etc.); cu angiospermele (*Gunnera* sp.).

Simbioza *Rhizobium*-plante leguminoase este sistemul fixator cel mai eficient. De exemplu, capacitatea fixatoare a sistemului *Rhizobium*/lucernă sau *Rhizobium*/lupin poate reprezenta între 350 şi 600 kg N/ha/an.

Amonificarea

Cea mai mare parte a azotului din straturile superficiale ale solului este prezent sub formă de combinaţii organice. El provine din proteinele vegetale sau animale, din biomasa microbiană, din excretele animale etc.

În climatul temperat, o rezervă majoră de azot organic este asociată cu humusul şi devine disponibilă după mineralizare lentă. Extractele de sol conţin, practic, toţi aminoacizii existenţi, legaţi în diferite combinaţii organice şi mici cantităţi (2-400 ppb) ca aminoacizi liberi, glucide aminate, baze purinice şi pirimidinice, etc.

Mineralizarea azotului organic din sol este un proces esenţial pentru ciclul acestui element în natură, deoarece asigură conversia la forme anorganice, utilizabile de către plante şi microorganisme.

Amonificarea evoluează în două etape:

- etapa nespecifică, de proteoliză, este realizată de microorganisme heterotrofe: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium, Aspergillus, Mucor* etc. cărora li se adaugă efectul proteazelor de origine vegetală sau animală. În această etapă, moleculele organice complexe sunt hidrolizate la molecule mai mici care pot pătrunde în celule, fiind utilizate de microorganisme sau sunt degradate în etapa următoare. Enzimele implicate în etapa nespecifică sunt: *endopeptidaze*, care atacă lanţul polipeptidic în interior, eliberând peptide de diferite lungimi. Unele endopeptidaze au acţiune nespecifică, iar altele au acţiune specifică deoarece recunosc anumite resturi de aminoacizi şi hidrolizează legăturile peptidice din vecinătatea lor. *Peptidazele* sunt exopeptidaze (amino- sau carboxipeptidaze). Ambele tipuri de enzime eliberează di- sau tripeptide, care sub acţiunea di- sau tripeptidazelor, eliberează aminoacizi liberi. Acest proces interesează numai o mică fracţie a azotului organic, restul fiind rezistent la degradare datorită formării complexelor ligninoproteice sau datorită încorporării în reţeaua cristalină a argilelor minerale;

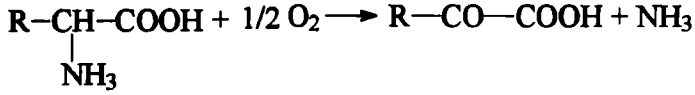
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- *etapa specifică* este rezultatul acţiunii microorganismelor din sol, care asigură degradarea aminoacizilor, hidroliza acizilor nucleici şi a ureii, a acidului uric, a glucidelor aminate şi conversia lor la NH_3.

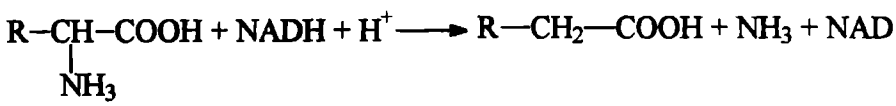
În sens strict, amonificarea este procesul de eliberare a NH_3, prin acţiunea microorganismelor asupra moleculelor rezultate din descompunerea proteinelor, acizilor nucleici etc. Producerea şi eliberarea NH_3 prin acţiunea microorganismelor de putrefacţie nu este un proces de amonificare.

NH_3 este rezultatul reacţiilor de *dezaminare*, care se produc pe mai multe căi:

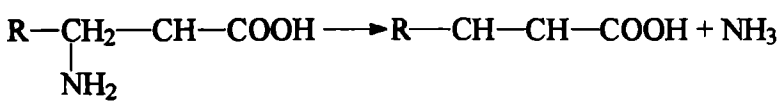
Dezaminarea oxidativă, descrisă la *Proteus* sp., *Ps. aeruginosa, E. coli* etc., după reacţia:



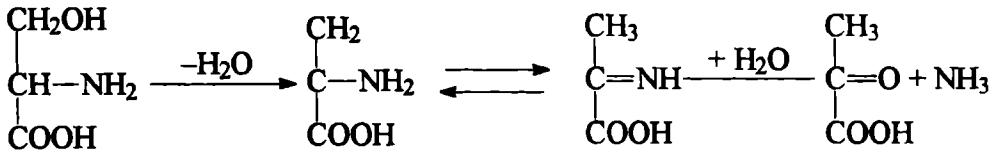
Dezaminarea reductivă, caracteristică aproape exclusiv bacteriilor anaerobe (*Clostridium* sp.), urmează calea:



Dezaminarea desaturantă, descrisă la *E.coli, Proteus* sp., *Clostridium* sp., *Neurospora*, evoluează după reacţia:



Dezaminarea prin deshidratare, descrisă la *E. coli* şi *N. crassa* are loc printr-o serie de reacţii cuplate:



NH_3 format, fiind volatil este parţial eliberat în atmosferă, unde poate fi expus transformărilor fotochimice sau reacţionează direct cu oxizii sulfului pentru a produce sulfat de amoniu. Aceştia pot reveni în sol sau în apă, odată cu ploile sau prin depuneri de particule.

O altă parte din NH_3 este adsorbită temporar pe complexele argilo-humice, sau este convertit în condiţii de aerobioză la NH_4^+, care este oxidat la nitriţi şi ulterior la nitraţi.

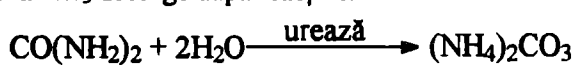
Amonificarea este un proces lent, care evoluează în condiţii optime, în straturile superficiale ale solurilor bine structurate şi aerate, la pH apropiat de neutralitate.

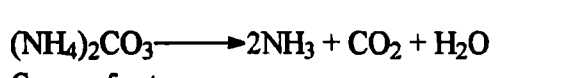
În faza nespecifică, acizii nucleici proveniţi din celulele vegetale, animale şi din microorganisme sunt clivaţi în polinucleotide şi în final, rezultă mononucleotide. Degradarea este catalizată de ribonucleaze, dezoxiribonucleaze etc., sintetizate de bacterii.

În etapa următoare, purinele şi pirimidinele neutilizate de alte microorganisme sunt degradate de bacterii până la stadiul de uree, care este supusă procesului de amonificare.

Amonificarea ureei este rezultatul acţiunii microorganismelor. Ureea din sol provine din excreţii, din metabolismul microorganismelor şi din degradarea bazelor purinice şi pirimidinice.

Conversia ureei la NH_3 decurge după reacţiile:





Compus foarte labil

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Activitatea amonificatoare a urobacteriilor este foarte importantă, deoarece ureea conține 47% N, care altfel ar rămâne neutilizat de plante. Cantitatea de uree eliminată în natură este foarte mare (zeci de milioane de tone/an).

Amonificarea este o etapă esențială a circuitului azotului în natură, prin care azotul organic este mineralizat în formă amoniacală, utilizabilă ca atare sau după oxidarea la nitrați, în nutriția minerală a plantelor.

Nitrificarea

Nitrificarea este un proces biologic prin care NH_3 sau alte forme reduse ale azotului anorganic, rezultate în procesul de amonificare sunt oxidate la nitrați, forma cea mai ușor asimilabilă de către plante.

Nitrificarea este realizată de bacterii chemolitotrofe obligate, în două etape succesive strâns cuplate:

Bacteriile care oxidează NH_3 (nitrit-bacteriile sau nitrosobacteriile) sunt Gram negative (*Nitrosomonas europea, Nitrosococcus nitrosus, Nitrosospira briensis, Nitrosolobus multiformis, Nitrosovibrio tenuis*) și au sisteme membranare complexe, intracelulare.

Bacteriile care oxidează nitriții (nitrat-bacteriile) sunt reprezentate de *Nitrobacter winogradskyi, Nitrococcus mobilis, Nitrospira gracilis, N. marina.*

Biochimia nitrificării este relativ puțin cunoscută, deoarece bacteriile se dezvoltă foarte greu pe medii artificiale (durata unei generații este de 10 ore-câteva zile).

Se admite că nitrificarea are loc după următoarele reacții:

$$1)\ NH_4^+ + 1\ 1/2O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H_2O + 2H^+ \text{ (Nitritarea)}$$

$$2)\ NO_2^- + H_2O \longrightarrow NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \text{ (Nitratarea).}$$

Nitriții apar constant în condiții de laborator ca produși intermediari ai procesului de nitrificare, dar existența lor în sol nu a fost evidențiată. De aceea s-a presupus existența unor bacterii care oxidează NH_3 direct la nitrați. În realitate, cele două grupuri fiziologice de bacterii coexistă în strânsă asociere în sol și nitriții rezultați din oxidarea NH_3 sunt utilizați imediat de nitrat bacterii. Nitriții sunt toxici și de aceea, transformarea lor rapidă are rol protector pentru organismele din sol.

Procesul nitrificării este favorizat prin ameliorarea aerării solului. Nitrații sunt ușor levigați și ajung în pânza de apă freatică, unde produc efecte negative: levigarea reprezintă o pierdere a azotului combinat din sol; nitritul reacționează cu compuși aminați din apa freatică și formează nitrozamine cancerigene; nitratul netoxic *per se* poate fi redus la nitriți de către bacteriile din microbiota intestinală și determină fenomene toxice consecutive combinării lor cu hemoglobina.

Denitrificarea

Denitrificarea este un proces biologic realizat în exclusivitate de bacterii și constă în reducerea dezasimilatorie a unuia sau a ambilor oxizi ionici ai azotului (NO_3^- și NO_2^-), la oxizi gazoși, ca oxidul nitric (NO) sau oxidul nitros (N_2O); aceștia pot fi ei înșiși reduși la N_2. Simultan, are loc oxidarea materiei organice din mediu, cu producerea de energie.

Bacteriile denitrificatoare formează un grup biochimic și taxonomic heterogen, care reunește peste 75 de genuri diferite. Unele sunt autotrofe și se dezvoltă în prezența CO_2 și a H_2 sau a compușilor reduși ai sulfului, dar cele mai multe sunt heterotrofe: *Alcaligenes faecalis, Azospirillum* sp., *Pseudomonas aerogenes, P. denitrificans* etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Nici o bacterie denitrificatoare nu este strict anaerobă. Ele preferă respiraţia aerobă şi au catenă transportatoare de electroni.

Denitrificarea este mai activă în condiţii de anaerobioză sau de tensiune redusă a O_2, în ape stagnante, în soluri umede sau inundate, în sedimente acvatice etc.

Biochimia denitrificării este complexă şi numai parţial cunoscută. Este un proces multienzimatic determinat de activitatea enzimelor nitrat-reductaze, nitrit-reductaze, oxidnitric-reductaza, care realizează secvenţa de reacţii:

$$NO_3^- \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2$$

Reducerea asimilatorie a nitraţilor este realizată de un număr foarte mare de bacterii, fungi filamentoşi, levuri, alge, plante superioare. Rezultatul este producerea de NH_3, care nu se acumulează, deoarece este utilizat de celule pentru biosinteza de constituienţi celulari.

CIRCUITUL OXIGENULUI

O_2 reprezintă 2% din aerul atmosferic, dar se găseşte şi într-o serie variată de compuşi organici şi anorganici din organismele vii, precum şi ca O_2 „fosil", legat de zăcăminte şi depozite de combustibili fosili.

Acumularea O_2 liber în atmosferă, considerată cea mai profundă transformare biogeochimică, a început acum 1,8 miliarde ani. Fenomenul a avut o importanţă covârşitoare, deoarece organismele multicelulare au evoluat numai după ce atmosfera s-a îmbogăţit cu acest element, prin fotosinteză. Cloud şi Gilbert (1970) apreciază că cea mai mare parte, dacă nu chiar tot O_2 liber din atmosferă este de origine biogenă şi provine prin fotoliza apei sub acţiunea energiei luminoase, în cursul fotosintezei.

Oxigenul este produs prin acţiunea plantelor verzi, a algelor şi a procariotelor din grupul *Oxyphotobacteria* (*Cyanobacteriales, Prochlorophytes* şi *Halobacterium*) în zona fotică a mediilor acvatice.

O parte din O_2 eliberat în atmosferă este convertit sub acţiunea radiaţiilor ionizante la ozon (O_3) şi sustras din circulaţia biogeochimică. O_3 asigură funcţia de ecran protector, oprind UV dăunătoare pentru organismele vii.

O altă parte din produşii primari ai fotosintezei sunt convertiţi în biomasa vegetală, ca oxigen structural, component al moleculelor din organismele vii (glucide, aminoacizi, lipide, etc.). Oxigenul reprezintă 1/4 din atomii materiei vii.

În sfârşit, o parte din oxigen este scos din ciclul biologic ca parte a ionului carbonat (CO_3^{2-}), fiind precipitat din soluţie şi stocat în rocile calcaroase.

Oxigenul provenit prin biofotoliza apei i se adaugă cel provenit din surse „nebiologice" sub formă de CO_2, apă şi oxizi anorganici. Ionii nitrat şi sulfat sunt surse de oxigen pentru unele organisme, care îi reduc la NH_3 şi respectiv la H_2S, iar apoi sunt reoxidati, circulând în biosferă. Rezervele de oxigen cele mai circulate sunt cel atmosferic şi dizolvat, din CO_2 şi din apă.

Rezervele de oxigen din materia organică vie sau neanimată, ca şi cantităţile mari de oxigen din compuşii minerali (inclusiv carbonaţi) sunt recirculate cu o rată foarte mică. Activităţile umane influenţează ciclul CO_2 în biosferă, prin combustia cărbunelui, a petrolului şi a gazelor care măresc conţinutul atmosferei în CO_2.

Rolul microorganismelor în circuitul oxigenului în natură este mai evident în mediile acvatice. Apele repede curgătoare sunt bine oxigenate. Curenţii oceanici asigură, în general, aportul de oxigen în apele oceanice şi marine, cu excepţia apelor din golfuri, fiorduri sau din unele mări interioare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O situaţie specială este aceea a unor bazine acvatice din regiunile temperate, în care vara are loc un proces de stratificare, determinat de temperatură. Apele mai calde de la suprafaţă sunt separate de straturile profunde situate sub termoclină (mai reci şi mai dense). Straturile profunde devin anaerobe. Materia organică se depune, unde este folosită ca sursă nutritivă de organismele facultativ aerobe. Ele reduc şi mai mult conţinutul în oxigen al apelor profunde. De aceea, în adâncul acestor ape se găsesc numai microorganisme obligat anaerobe (cele care nu tolerează concentraţii de O_2 mai mari de 1% din cele atmosferice) şi numai uneori microorganisme microaerofile. La începutul iernii se realizează o „răsturnare" a straturilor de apă, care determină aerarea celor adânci: apele la suprafaţă devin mai reci şi mai grele decât cele profunde şi asigură omogenizarea condiţiilor pe întreaga coloană de apă. Datorită acestor fenomene, unele lacuri din regiunile temperate, prezintă un ciclu anual de trecere alternativă sezonieră a apelor profunde, de la aerobioză la anaerobioză şi invers.

În râurile în care sunt deversate cantităţi mari de substanţe organice sub formă de ape uzate sau de poluare industrială, concentraţia oxigenului dizolvat scade semnificativ. Cantitatea mare de substanţă organică determină creşterea excesivă a bacteriilor heterotrofe şi un deficit de oxigen.

CIRCUITUL CARBONULUI

Carbonul, element biogen esenţial pentru existenţa sistemelor biologice se găseşte în combinaţii organice sau anorganice, repartizate în rezervoare cu circulaţie rapidă, precum şi stocat în forme care circulă foarte lent sau deloc.

Forma cea mai rapid circulantă este CO_2 atmosferic, care reprezintă 0,032% (320 ppm), echivalent cu o cantitate globală de 70.000 tone C. În apa mării, C anorganic este prezent în soluţie sub formă de CO_2, H_2CO_3, HCO_3^- şi CO_3^{2-}, sau precipitat sub formă de carbonaţi insolubili.

Atmosfera şi hidro-ecosfera sunt strâns legate, astfel încât asigură un schimb echilibrat de CO_2. Se apreciază că în fiecare an, 100 miliarde tone de CO_2 atmosferic sunt dizolvate în mare şi o cantitate echivalentă de CO_2 oceanic este transferată în atmosferă. Un echilibru asemănător caracterizează schimburile dintre litosferă şi atmosferă: cantitatea de CO_2 atmosferic, fixată prin fotosinteză este compensată prin eliberarea de CO_2, provenit din descompunerea substanţelor organice prin mineralizare. Cu excepţia unor factori perturbatori de origine antropogenă, concentraţia CO_2 atmosferic nu este expusă unor variaţii semnificative.

Circulaţia CO_2 (atmosferă $\Leftrightarrow$ sol şi atmosferă $\Leftrightarrow$ ocean), ca şi circulaţia $CO_2 \Leftrightarrow$ C organic sunt foarte rapide, datorită faptului că rezervorul de CO_2 este limitat cantitativ. După Stanier, Adelberg şi Doudoroff (1970), în absenţa recirculării, CO_2 ar fi fixat total în fotosinteză în circa 20 de ani, sau după alţii, în 40-50 de ani, după care orice formă de viaţă ar înceta să mai existe.

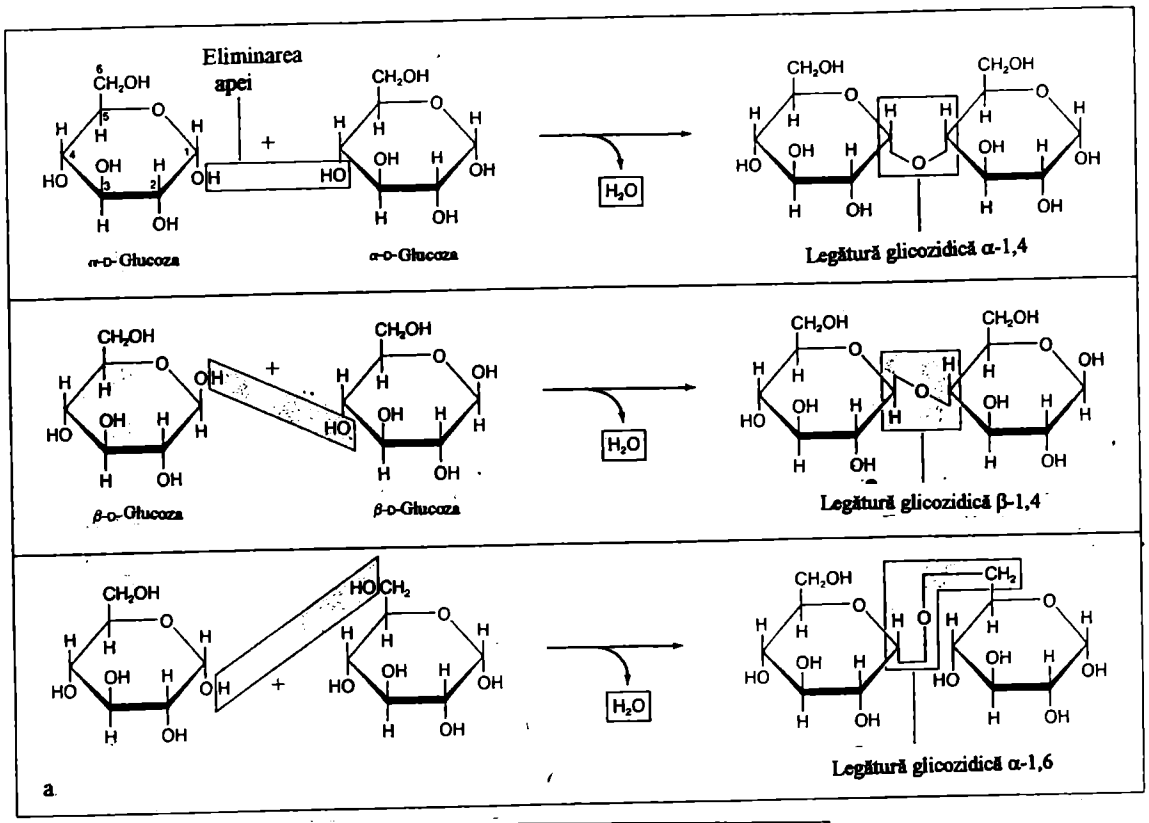
Circulaţia biogeochimică a C implică existenţa a două cicluri distincte: unul cu evoluţie terestră şi celălalt oceanic, interconectate dinamic la interfaţa cu atmosfera.

Degradarea biologică a constituienţilor vegetali

Subtanţele organice, componente ale peretului celular vegetal sunt *polizaharidele, lignina* şi *subtanţele accesorii* nestructurale.

Polizaharidele sunt glucide cu g m mare, cu rol predominant structural şi sunt reprezentate de celuloză, hemiceluloze, subtanţe pectice (cu rol de liant), manani, galactani, glucani şi xilani etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



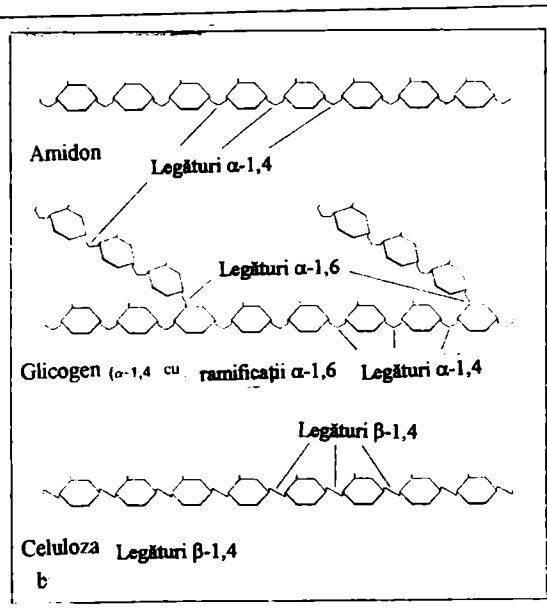


Fig. 253. a. Formarea polizaharidelor din monozaharide. b. Structurile generale polizaharidelor comune.

Lignina, cel mai puțin definită structural dintre constituienții lemnului, reprezintă 20-35% din structura acestuia.

Substanțele accesorii (nestructurale) sunt extractibile (terpeni, fenoli, rășini etc.) sau neextractibile (regăsite în cenuși ca oxalați, carbonați, cristale de siliciu). Ele măresc rezistența celulozei la degradare și la atacul insectelor.

Degradarea biologică a celulozei

Celuloza este un constituient major al materialelor vegetale și cel mai abundent material organic prezent în natură. Degradarea biologică a celulozei are o importanță fundamentală pentru circuitul C în natură.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Din punct de vedere chimic, celuloza este un polimer linear, alcătuit din unităţi repetate de celobioza (4-o-(β-D-glucopiramozil)-D-glucopiranoza, respectiv din 8000-12000 unităţi de anhidro-D-glucoza, unite prin legături glicozidice 1,4-β-D. Numărul unităţilor şi gradul de polimerizare sunt variabile în funcţie de proveniența moleculelor.

În condiţii de laborator sau industriale se pot obţine celuloze modificate fizic sau chimic prin tratare cu acizi sau alcani, sau substituite chimic (de exemplu, trinitrofenil-celuloza sau carboximetil-celuloza).

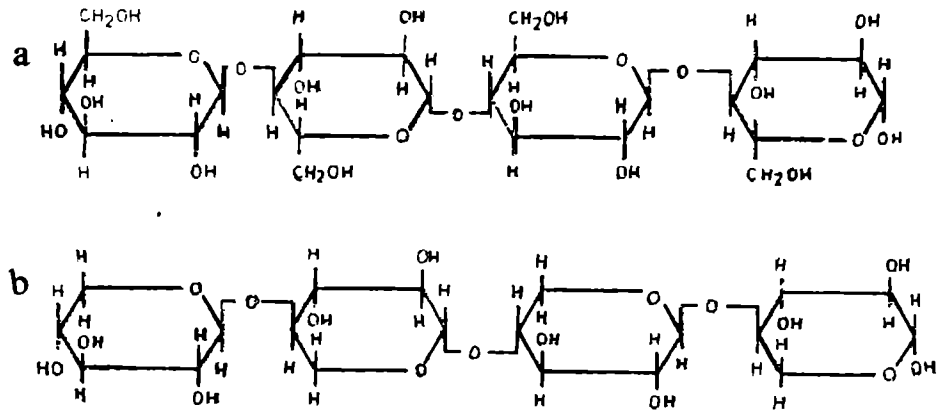


Fig. 254. Structura chimică a celulozei (a) şi hemicelulozei (b).

Structura şi morfologia fibrelor de celuloză

Deşi structura primară a celulozei este relativ simplă, structura sa terţiară (sau cuaternară) este foarte complicată, fapt care explică marea sa rezistenţă la degradarea enzimatică.

În structurile naturale, circa 100 molecule de celuloză sunt legate împreună pentru a forma *fibrile elementare* sau *protofibrile*. Ele au lungimea de circa 100 A, lăţimea de 40 A şi grosimea de 30 A şi sunt alcătuite din molecule de celuloză aliniate paralel şi legate prin punţi de H. Un număr de circa 20 (± 5) fibrile elementare se agregă într-un fascicul lung şi subţire numit *microfibrilă*. Prin asocierea a circa 250 microfibrile rezultă o *fibrilă*, iar din unirea a 1500 fibrile rezultă *fibra macroscopică*, vizibilă cu ochiul liber.

De-a lungul microfibrilelor, moleculele de celuloză conţin zone extinse cu organizare ordonată, corespunzând *regiunile cristaline*, ce alternează cu zone mai puţin ordonate, numite *paracristaline* sau *amorfe*, uşor atacate de enzime şi agenţii fizici şi chimici.

O consecinţă a modului de organizare foarte ordonată a fibrelor de celuloză, este că nici o moleculă de apă sau de enzime nu poate intra în structura lor, motiv pentru care celuloza este inertă în intestinul multor animale. Pretratarea *in vitro* cu acizi sau alcali creează structuri deschise ce favorizează atacul enzimatic.

În celuloza nativă, regiunea cristalină poate reprezenta până la 70% din lungimea microfibrilelor.

În plantele ierboase şi în legume, celuloza reprezintă circa 15% din greutatea uscată, iar în plantele lemnoase, peste 50%.

Microorganisme celulozolitice

Peste 200 de specii de microorganisme (eubacterii, actinomicete, microfungii (levuri, şi mucegaiuri) şi protozoare produc celulaze şi degradează celuloza: *Clostridium cellulovorans, C. cellulolyticum, C. stercorarium, C. thermocellum, Bacillus cereus, B. polymyxa,*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

B. licheniformis, B. subtilis, Cellulomonas fini, C. flavigena, Cytophaga sp., Sporocytophaga, Aspergillus sp., Phoma, Trichoderma, Verticilium, Alternaria, Botrytis, Cephalosporium, Chaetomium, Fusarium, Macrosporium, Penicillium, etc.

Sistemul enzimelor celulazice

Toate microorganismele care degradează celuloza cristalină produc sisteme celulazice, formate dintr-o varietate de enzime care acţionează cooperant. Sistemul enzimatic descris la *Trichoderma reesi* este alcătuit din trei tipuri majore de enzime:

1) *Endo-β-1,4-glucanaza* (EG) hidrolizează aleatoriu legăturile β-1,4-glicozidice din mijlocul moleculei de glucoză. Nu atacă celobioza, dar hidrolizează celodextrinele şi celulozele substituite (carboximetilceluloza).

2) *Celobiohidrolaza* (CBH) este o exo-β-1,4-glucanază. Acţionează asupra celulozei, secţionând treptat unităţi de celobioză de la extremitatea nereducătoare a catenei de polimer. Are o mare specificitate de substrat şi este capabilă să degradeze peste 80% din celuloza cristalină.

3) *β-glucozidaza* hidrolizează celobioza şi celooligozaharidele, la glucoză. Nu atacă celuloza şi nici celodextrinele cu g.m. mare. Deşi nu este o celulază *per se*, ci, în special o celobioză, β- glucozidaza favorizează procesul de degradare enzimatică a celulozei. Hidrolizează celobioza, împiedicând acumularea ei în mediu.

Capacitatea de a degrada celuloza naturală implică sinteza întregului sistem enzimatic. Multe microorganisme pot degrada celuloza parţial degradată, nu însă şi celuloza nativă. Ele produc anumite enzime celulozolitice, dar le lipseşte una din enzimele esenţiale.

Degradarea microbiană a hemicelulozelor

Hemicelulozele, polizaharide asociate cu celuloza în structura peretelui celulelor vegetale, reprezintă principala fracţiune necelulozică a polizaharidelor vegetale, constituind 5-25% din greutatea uscată a acestora, în funcţie de specie şi de vârsta plantelor.

Hemicelulozele izolate din ţesuturile vegetale, după tratamentul cu acizi minerali la cald eliberează pentoze, hexoze şi uneori, acizi uronici. Pentozele sunt reprezentate de xiloză şi arabinoză, hexozele, de manoză sau galactoză, iar acizii uronici, de acidul glucuronic ($C_6H_{10}O_7$) sau de acidul galacturonic ($C_6H_{10}O_5$).

Hemicelulozele apar sub forma unor polimeri lineari alcătuiţi dintr-o singură pentoză (pentozani) sau hexoză (hexozani). Pentozanii sunt xilani sau arabani, iar hexozanii sunt manani sau galactani. Hemicelulozele care conţin acizi uronici se numesc *hemiceluloze poliuronidice*, iar cele lipsite de aceştia, *celulozani*.

Cel mai important celulozan este *xilanul*, format exclusiv din 50-150 resturi de xiloza, legate β-1,4 sau conţine cantităţi mici de L-arabinoza.

Degradarea enzimatică a hemicelulozelor este realizată de enzime extracelulare şi evoluează în două etape succesive:

- etapa conversiei moleculelor polimerice la oligoglucide sau la monomeri (xilotrioza, xilobioza, xiloza- în cazul xilanului);
- etapa utilizării moleculelor simple, ca sursă de C şi energie.

După modul de acţiune, hemicelulazele sunt de două tipuri: unele xilanaze sunt de tip *endo*, deoarece scindează legăturile β-1,4 din interiorul catenei polizaharidice; altele sunt de tip *exo* şi atacă polimerul la nivelul extremităţilor libere.

Microorganismele active sunt bacterii (*Achromobacter, Bacillus, Cytophaga, Pseudomonas, Streptomyces, Vibrio*, etc) sau fungi (*Aspergillus, Chaetomium, Penicillium, Rhizopus*).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Degradarea microbiană a ligninei

Lignina este cel mai abundent material aromatic reînoibil şi, după celuloză, al doilea material organic în natură.

Lignina este un polimer aromatic tridimensional, insolubil în apă, alcătuit din unităţi fenil-propan, rezultat prin cuplarea aleatorie a trei tipuri de alcooli precursori:

1) Alcoolul p-cumarilic, care în polimer formează unităţi de p-hidroxifenil;

2) Alcoolul coniferilic, care formează unităţi de guaiacil;

3) Alcoolul sinapilic, în polimer formează unităţi de siringil.

Copolimerizarea relativ aleatorie a acestor alcooli determină formarea unui polimer heterogen, cu o mare heterogenitate de structură şi rezistenţă la degradare. Unităţile de bază sunt menţinute asociat prin legături C-C sau aril-eter.

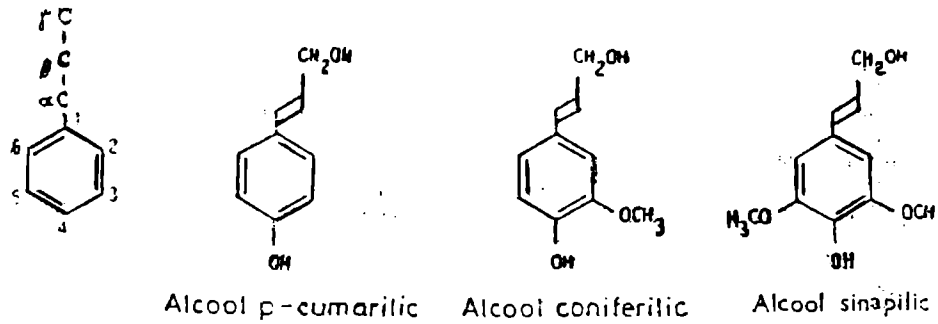


Fig. 255. Formulele chimice ale alcoolilor precursori ai ligninei şi nomenclatura atomilor de carbon din structura lor.

Cei trei monomeri precursori sunt prezenţi în proporţii variabile în funcţie de specia plantei, de tipul de ţesut etc.

Lignina este degradată de fungi şi bacterii. Acţiunea ligninolitică a bacteriilor este moderată. Principalii agenţi ai degradării ligninei în natură sunt fungii putregaiului alb. Cel mai studiat este *Sporotrichum pulverulentum*, care secretă enzime ce degradează lignina şi alţi constituienţi ai lemnului. Eficienţa deosebită a fungilor putregaiului alb, după Atlas şi Bartha (1987) se datorează producerii unor agenţi oxidanţi ca H_2O_2, anionul superoxid (O_2^-), radicalul hidroxil(-OH), oxigenul singlet ($^1O_2$), care rup legăturile dintre subunităţile componente ale ligninei, producând depolimerizarea acesteia.

Enzima esenţială pentru degradarea ligninei este *ligninaza (ligninperoxidaza)*, o oxireductază care conţine *hem*. A fost definită ca o oxigenază care necesită H_2O_2 (Tien şi Kirk, 1984). În prezenţa H_2O_2, ligninaza catalizează oxidarea ligninei şi a compuşilor înrudiţi, cu producere de radicali cationici.

Mn-peroxidaza, prezentă în mediul de creştere a fungilor putregaiului alb, oxidează fenolii şi participă, probabil la producerea apei oxigenate.

Fenoloxidazele sunt enzime extracelulare produse de fungii putregaiului alb. Rolul lor în degradarea ligninei este puţin cunoscut.

Descompunerea ligninei este un proces oxidativ, stimulat de creşterea tensiunii oxigenului şi are loc numai în prezenţa unei surse de C mai uşor metabolizabilă şi în condiţiile limitării sursei de azot.

Degradarea chitinei

Chitina este un polimer de N-acetil glucozamină, cu o structură asemănătoare celulozei, de care se deosebeşte prin prezenţa azotului în structura sa. Formula chimică globală este $(C_6H_9O_4.NH\text{-}CO\text{-}CH_3)_n$. Este formată dintr-un lanţ lung de unităţi de N-acetil glucozamină, dispuse într-un aranjament linear.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

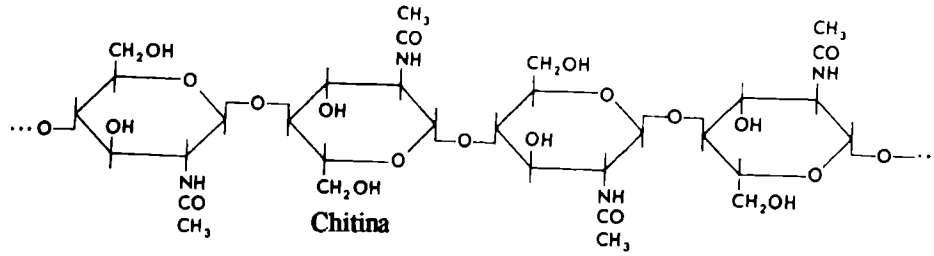


Fig. 256. Structura chimică a chitinei.

Chitina este insolubilă în apă, în solvenţi organici şi în alcali concentraţi. Poate fi solubilizată enzimatic sau cu acizi minerali concentraţi. Se găseşte în peretele celular al fungilor (2,6-26% din greutatea uscată), la unele alge verzi, la nematode, anelide, moluşte, celenterate, artropode. Chitina este degradată de unele bacterii şi de unii fungi.

Toate microorganismele chitinolitice produc o *chitinază* extracelulară care atacă polimerul lung, producând separarea subunităţilor de bază de N-N-diacetilchitobioză. Acestea sunt atacate de *chitobiază* şi hidrolizate la glucozamină (2-amino-glucoză) şi acid acetic, utilizabile ca sursă de C şi energie de alte microorganisme.

Chitinoliza are o amploare deosebită în mediul marin şi oceanic şi este un proces semnificativ pentru ciclul biogeochimic al C.

Scoaterea din circuit a C organic sau anorganic

Unele subtanţe rezistente sau chiar "recalcitrante" la degradare sunt scoase pentru perioade mai lungi sau mai scurte din circuitele naturale. Scoaterea din circuit a unor cantităţi mari de compuşi ai C, organici sau anorganici, inaccesibile vieţii reprezintă imperfecţiuni ale ciclului.

Humusul constituie o mare parte a substanţei organice din sol. El se formează prin conversia intermediarilor fenolici, rezultaţi din degradarea ligninei. Humusul este foarte rezistent la degradarea microbiană, componentele sale având o vechime cuprinsă între 20 şi 2 000 ani, stabilită prin studiile de datare cu C^{14}. Substanţele humice reprezintă o situaţie intermediară în raport cu cea a combustibililor fosili.

Depozitele anorganice de C se formează prin precipitarea $CaCO_3$, rezultat din combinarea acidului carbonic dizolvat în apa mării, cu Ca^{2+} în condiţii slab alcaline.

Formaminiferele, moluştele, coralii etc., formează "depozite biologice" de C anorganic.

CIRCUITUL FOSFORULUI ÎN NATURĂ

Fosforul este un element esenţial pentru existenţa sistemelor biologice, datorită prezenţei sale în moleculele de ADN, ARN, în fosfoplipidele din structura membranelor celulare, în glicerofosfaţi, unele coenzime, precum şi în moleculele de ADP şi ATP. Fosforul este prezent în moleculele de fitină provenite din ţesuturile vegetale, în compoziţia oaselor, ca fosfat de calciu (85%) şi ca fosfat de magneziu (1,5%).

Rezervorul major de fosfor în natură, este roca fosfatică *apatita* ($3Ca_3(PO_4)_3.CaF_2$), insolubilă. În sol se găseşte sub forma fosfaţilor hidrataţi ($FePO4.2\ H_2O$ şi $AlPO_4.2\ H_2O$), ce provin din eroziunea lentă a apatitei. Fosforul din sol se găseşte în proporţie de 95-99% în forme inaccesibile direct plantelor şi microorganismelor. Din aceasta, 30-85% sunt compuşi organici, proveniţi din resturile vegetale, animale şi din microorganisme (fitina, acizii nucleici, fosfolipide, glucide fosforilate).

Fosfaţii anorganici sunt *insolubili* (fosfaţi de calciu, fier, aluminiu) şi *solubili*. În fosfaţii primari (NaH_2PO_4), numai una din cele trei valenţe ale PO_4^{3-} este legată de un metal. Fosfaţii

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

secundari (Na_2HPO_4) au numai un atom de H, iar cei terţiari (Na_3PO_4), nici unul. Solubilitatea lor este progresiv mai mică. În mediile acvatice, concentraţia fosfaţilor este foarte mică, dar creşte de câteva ori în celulele algelor şi ale altor microorganisme. De aici sunt transferaţi sub forma combinaţiilor organice la animale care se hrănesc cu fitoplancton.

Microorganismele sunt implicate în patru mecanisme majore ale transformării fosforului în circuitul său în natură.

1) *Mineralizarea compuşilor organici* ai fosforului din sol de către microorganisme heterotrofe şi regenerarea ortofosfaţilor solubili. Degradarea implică participarea unui număr de enzime de tipul nucleazelor, fosfolipazelor, fosfatazelor, glicerofosfatazelor. Fitina, sarea de Ca şi Mg a acidului fitic, este degradată lent sub acţiunea fitazei produsă de unele bacterii şi microfungi. Compuşii cu fosfor originari în celulele microbiene şi animale sunt degradaţi mai rapid şi procesul este favorizat de autoliza celulelor moarte. Ortofosfaţii solubili rezultaţi la sfârşitul procesului de mineralizare, urmează două căi: o parte sunt asimilaţi de microorganismele care i-au solubilizat; o altă parte este convertită la forme greu solubile (fosfaţi de Ca, Mg, Fe, Al).

2) *Solubilizarea fosfaţilor anorganici* ($Ca_3(PO_4)_2$ şi a fosfaţilor de Fe, Mg, Al) şi eliberarea fosfaţilor solubili accesibili plantelor. În sol procesul are loc cu precădere în rizosferă.

3) *Imobilizarea fosforului* în celulele microorganismelor. Procesul are loc şi în organismele plantelor şi animalelor, prin sinteza acizilor nucleici, a fosfolipidelor, a fitinei, a glucidelor fosforilate, etc.

4) *Procese de oxidare a fosorului anorganic*. Ortofosfatul este forma cea mai oxidată a fosforului. Unele microorganisme aerobe pot utiliza *fosfiţii* (HPO_3^{2-}), convertindu-i la fosfat după reacţia:

$$H_3PO_3 + 1/2O_2 \rightarrow H_3PO_4$$

Acid fosforos Acid ortofosforic

În anaerobioză, *Cl. butyricum* face reacţia inversă, de reducere a fosfatului la fosfit şi la hipofosfit după reacţia:

$$H_3PO_4 \rightarrow H_3PO_3 \rightarrow H_3PO_2$$

Acid hipofosforos

Recircularea fosforului în biosferă este numai parţială, deoarece este asociată cu pierderi continue; care sustrag cantităţi importante din compuşi necesari sistemelor biologice. Imperfecţiunile ciclului determină fenomene de deficit de P în sol şi în mediile acvatice, cu consecinţe negative asupra producţiei primare a ecosistemelor respective.

O altă pierdere este transferul permanent, unidirecţional de P din sol şi mare. Cantităţi importante de P din mediile acvatice se sedimentează în straturile profunde, devenind inutilizabile pentru viaţă.

CIRCUITUL SULFULUI ÎN NATURĂ

Sulful este un component esenţial al biosferei, ca parte a structurii chimice a organismelor vii. Se găseşte în sol, ape şi atmosferă şi ocupă locul 13 în ceea ce priveşte distribuţia cantitativă a elementelor în natură. Citoplasma conţine între 0,4-1% S sub forma unor compuşi organici.

S este prezent în natură sub două forme:

1) În formă *anorganică*, în depozitele de S elementar (S^0) sau într-o varietate de compuşi reduşi (H_2S, diferite sulfuri metalice), sau oxidaţi ca SO_2, SO_3, tiosulfaţi ($S_2O_3^{2-}$), tetrationaţi ($S_4O_6^{2-}$), sulfaţi (SO_4^{2-}) sau H_2SO_4.

2) În formă *organică*, în compoziţia unor aminoacizi (cistină, cisteină, metionină), a glutationului.

Hidrogenul sulfurat (H_2S) se găseşte în bălţi, izvoare sulfuroase, gaze naturale şi în medii cu substanţe organice în curs de descompunere. Are origine vulcanică, hidrotermală sau

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

biologică (produs al activității microorganismelor). H_2S nu se acumulează în natură, deoarece în prezența oxigenului se oxidează rapid, spontan la SO_2.

Dioxidul de sulf (SO_2) rezultă din oxidarea H_2S, din gazele industriale etc. SO_2 reprezintă circa 95% din compușii S rezultați din arderea combustibililor fosili. SO_2 este redus la H_2S prin acțiunea bacteriilor, iar în aer este oxidat la SO_3 prin acțiunea radiațiilor UV. SO_2 poate interacționa cu oxigenul atomic după reacția: $SO_2 + O + M \rightarrow SO_3 + M$, în care M este o moleculă de O_2 sau N_2 și oxigenul atomic are rolul de a prelua excesul de energie din reacție, împiedicând reversia ei.

Trioxidul de sulf (SO_3) reacționează prompt cu vaporii de apă și formează acid sulfuric.

Sulfații provin din roci sau din apa de ploaie, în care derivă probabil din SO_2 din aer. Sulfatul este extrem de stabil la reducere chimică. Cel mai adesea, reducerea sa este rezultatul acțiunii directe a bacteriilor sulfat-reducătoare. În anaerobioză, sulfații sunt reduși la H_2SO_4 și S^0.

Ciclul biologic al S natură implică participarea a patru tipuri de reacții:

1) Mineralizarea compușilor organici ai S din componența celulelor.

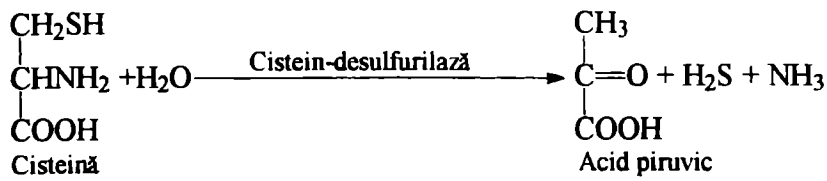
2) Oxidarea compușilor anorganici și din aminoacizi.

3) Asimilarea compușilor anorganici și încorporarea lor în materia vie.

4) Reducerea sulfatului și a sulfului elementar la sulfuri (reducerea dezasimilatorie și asimilatorie a sulfatului).

Mineralizarea compușilor organici ai sulfului

Compușii organici ai S depuși în sol odată cu dejecțiile animale și cu țesuturile vegetale și animale moarte, nu pot fi utilizați ca atare de plantele superioare. Mineralizarea este rezultatul acțiunii directe a unor microorganisme de putrefacție: *E. coli, P. aeruginosa, Proteus* sp., *Clostridium sporogenes,* etc. Reacția are la bază protcoliza urmată de eliberarea S din compoziția aminoacizilor cu S:



Cisteină — Acid piruvic

Produșii majori ai degradării sunt, în anaerobioză H_2S, iar în aerobioză H_2S, mercaptanii și diferiți compuși minerali, parțial sau complet oxidați (H_2SO_4).

Oxidarea compușilor anorganici ai S

H_2S produs în natură pe diferite căi (descompunerea produșilor cu S, reducerea sulfatului, activitatea vulcanică etc.) este numai într-o mică măsură imobilizat ca sulfuri instabile sau oxidat spontan la S^0 în prezența oxigenului. Cea mai mare parte a H_2S, ca și a S^0 sunt oxidate pe cale biologică.

Cele mai studiate sunt bacteriile din g. *Thiobacillus* cu speciile: *T. thiooxidans, T. thioparus, T. ferooxidans,* etc, precum și din g. *Thiomicrospira* și *Sulfolobus*. Trăiesc în medii bogate și S^0 și H_2S (lacuri, bălți, mări, apa de canal, izvoare termale acide). Oxidează S^0 și diferiți compuși anorganici ai acestuia, după reacțiile:

Th. thiooxidans: $2\ S^0 + 3\ O_2 + 2\ H_2O \rightarrow 2\ H_2SO_4$

Th. thioparus: $H_2S + 2O_2 \rightarrow H_2SO_4$

$Na_2S_2O_3 + 2O_2 + H_2O \rightarrow Na_2SO_4 + H_2O$

$2Na_2S_4O_6 + 7O_2 + 6H_2O \rightarrow 2Na_2SO_4 + 6H_2SO_4$

Oxidarea S^0 la sulfat este însoțită de o producere masivă de H^+. Mediul se acidifică până la pH 1,0.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Th. ferooxidans este în acelaşi timp sulf- şi ferooxidantă, deoarece oxidează S°, H_2S, $S_2O_6^{2-}$(tetrationat), SO_3^{2-}(sulfit) la H_2SO_4 şi respectiv la sulfaţi, dar şi Fe^{3+}:

$2FeS_2 + 2H_2O + 7O_2 \rightarrow 2FeSO_4 + 2H_2SO_4$

$4\ FeSO_4 + O_2 + 2H_2SO_4 \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2O$

Al doilea grup de bacterii sulfoxidante este reprezentat de bacteriile din genurile: *Beggiatoa, Thiotrix, Thioploca, Thiobacterium, Thiospira* etc. Cele mai multe nu au fost izolate în culturi pure şi se găsesc în medii care conţin H_2S şi O_2. Reacţia majoră este:

$$2H_2S + O_2 \Leftrightarrow 2S^{\circ} + 2\ H_2O$$

Sulful elementar este depus sub forma unor granulaţii refringente. Reacţia este reversibilă: după epuizarea H_2S din mediu, S° din incluziuni este oxidat la H_2SO_4.

Al treilea grup de bacterii sulfoxidante sunt bacteriile fotosintetizante sulfuroase. Ele aparţin la două categorii:

a) Bacteriile sulfuroase purpurii (*Thiorhodaceae*), care se deosebesc în funcţie de modul în care depun incluziile de S°: *Ectothiorhodospira* depune S° extracelular, iar *Thiospirilium, Thiocystis, Thiocapsa, Chromatium, Lamprocystis* şi *Rhodothecae* depun S° intracelular.

b) Bacteriile sulfuroase verzi - *Chlorobiaceae (Chlorobium, Chloropseudomonas, Pelodictyon*) utilizează H_2S ca donor de electroni pentru reducerea CO_2. S° format ca intermediar în oxidarea sulfurilor la sulfat este depus extracelular.

Bacteriile fototrofe purpurii şi verzi utilizează compuşi ai sulfului (H_2S, $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-}), iar unele chiar compuşi organici. Energia stocată ca rezultat al fotosintezei este folosită pentru sinteza constituienţilor celulari de la CO_2, după reacţia:

$$H_2S + 2CO_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{lumină}} H_2SO_4 + 2(CH_2O)$$

Reducerea asimilatorie a sulfaţilor este catalizată în exclusivitate de bacterii, de unele levuri şi de plante, dar niciodată de organismele animale. Produsul final al reducerii asimilatorii a sulfatului este *cisteina,* de la a cărei gruparc -SH derivă ceilalţi aminoacizi cu sulf, precum şi biotina, tiamina, acidul pantotenic, glutationul.

Reducerea dezasimilatorie a sulfaţilor semnifică utilizarea lor ca acceptor final de electroni în procese de dezasimilare a unor substraturi organice în respiraţia anaerobă. Procesul s-a denumit *respiraţia* sulfatului. Numai o mică parte din sulfatul redus este asimilat de organism, cea mai mare parte fiind eliberat în mediul extern ca S^{2-} sau ca H_2S liber.

Hidrogenul necesar pentru reacţie poate fi furnizat de compuşi organici ca lactatul, după reacţia:

$2C_3H_5O_3Na + MgSO_4 \rightarrow H_2S + 2C_3H_3O_2Na + MgCO_3 + CO_2 + H_2O$

sau de H_2, pentru reducătorii de sulfat autotrofi, după reacţiile:

$4\ H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-} + 4\ H_2O$

$3\ H_2 + SO_3^{2-} \rightarrow S^{2-} + 3\ H_2O$

$4\ H_2 + S_2O_3^{2-} \rightarrow S^{2-} + H_2S + H_2O$

$9\ H_2 + S_4O_6^{2-} \rightarrow S^{2-} + 3\ H_2S + 6\ H_2O$

$4\ H_2 + CaSO_4 \rightarrow H_2S + Ca(OH)_2 + 2\ H_2O.$

Bacteriile sulfat reducătoare reprezintă principalul producător de H_2S în natură.

Depozitele de sulf au cel mai adesea o origine biogenă şi s-au format prin reducerea sulfaţilor, urmată de o etapă de oxidare, la care au participat bacteriile sulfoxidante. Dovada o constituie existenţa sulfuretelor, în care se acumulează şi în prezent.

Bacteriile sulfat-reducătoare ce se dezvoltă în apele de canal, în apele stagnante şi în apele din porturile intens poluate, determină mirosul neplăcut cauzat de producerea intensă de H_2S. Reducerea masivă a sulfaţilor în natură este rezultatul activităţii bacteriene sulfat-reducătoare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

E. NOTIUNI DE MICROBIOLOGIA APELOR

Importanţa prezenţei şi activităţii microorganismelor în aproape toate tipurile de acumulări de apă, de la cele subterane la cele mici şi temporare, de suprafaţă şi la cele mari, cum sunt mările şi oceanele, a devenit evidentă curând după apariţia Microbiologiei ca ştiinţă.

Microbiologia apelor studiază comunităţile de microorganisme prezente în izvoare, râuri şi fluvii, lacuri, bălţi, mări şi oceane. Ea studiază interacţiunile dintre microorganismele componente sau ale microorganismelor cu alte organisme (plante sau animale), rolul lor în fluxul de materie şi energie şi în circuitul biogeochimic al elementelor în apă şi sedimente, precum şi comportamentul formelor terestre în mediile acvatice.

Tipurile de medii acvatice

În funcţie de natura habitatelor caracteristice, mediile acvatice naturale se împart în:

1) *Ape de suprafaţă*. Ele reprezintă medii adecvate pentru numeroase microorganisme şi se diferenţiază prin proprietăţile fizico–chimice ale apei. Apele de suprafaţă sunt de două tipuri:

a) *ape dulci* sau *limnetice*, care la rândul lor sunt de două categorii:

- *ape lentice* (stagnante), de tipul lacurilor, bălţilor, mlaştinilor, etc. sau ape care se deplasează lent;

- *ape lotice* (curgătoare), de tipul izvoarelor, râurilor, fluviilor;

b) *ape marine* şi *oceanice*.

2) *Ape subterane* (engl. "ground water"), *freatice* sau *acvifere*.

În funcţie de concentraţia lor în săruri, apele naturale pot fi clasificate ca: ape dulci (0-1 g/l); ape salmastre (1-25 g/l); ape sărate (25-50 g/l); ape foarte sărate (>50 g/l).

În apele deschise, la distanţă de sol sau de sedimente, precum şi în lipsa altor organisme, densitatea microorganismelor atinge rareori limita minimă de 10^6/ml (10^6/g), considerată ca semnificativă pentru o contribuţie eficientă în ecosistem. Cele mai multe bacterii nu trăiesc libere în ape naturale, ci legate de plancton de diferite detritusuri sau sunt agregate. Cele prezente în stare liberă în apele dulci sunt rareori autohtone, cel mai adesea fiind în tranzit dintr-o localizare alta. Cel mai adesea, bacteriile din ape sunt mobile, dar deplasarea lor activă este puţin semnificativă pentru că se realizează pe distanţe foarte mici.

Sub raportul dispersării microorganismelor există o deosebire fundamentală între apele dulci şi marine.

În *apele marine*, microorganismele sunt răspândite pe suprafeţe mari prin deplasarea laterală a curenţilor orizontali, prin mişcările curenţilor verticali şi prin amestecul apelor de suprafaţă, produs de vânt. Oceanele sunt, în foarte mare măsură interconectate, formând un mediu unic, în care bacteriile pot fi purtate dintr-o regiune în alta, fără o intervenţie semnificativă a microorganismelor din sol sau din aer.

Apele dulci sunt mai puţin interconectate şi, ca urmare, microorganismele respective au mai multe caracteristici comune cu cele terestre decât cu cele marine.

Apele curgătoare repezi transportă frecvent microorganisme din sol la distanţe mari. Ajunse în ultimă instanţă în mări, microorganismele din apele dulci nu supravieţuiesc, datorită condiţiilor nefavorabile (salinitate, temperatură, presiune, diluţia nutrienţilor, etc.).

Apele freatice sunt lipsite, de cele mai multe ori, de microorganisme, deoarece ele sunt reţinute în straturile superioare ale solului, pe măsură ce apele se infiltrează. Cu excepţia cazurilor de poluare accidentală, ele au o încărcătură microbiană mică, în comparaţie cu apele de suprafaţă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Factorii fizici şi chimici care influenţează prezenţa microorganismelor în mediile acvatice

Lumina reprezintă un factor esenţial pentru asigurarea vieţii în ecosistemele acvatice deoarece iniţiază fluxul de energie, prin conversia energiei radiante solare, în energie chimică, asigurând dezvoltarea producătorilor primari care stau la baza lanţului trofic.

În funcţie de gradul de turbiditate a apei, lumina poate fi utilă pentru fotosinteză numai pe o adâncime de câţiva metri, în timp ce în largul oceanelor zona fotică se poate extinde între 0-200 m. După Campbell (1977), la adâncimea de 3-4 m, pătrunde numai 50% din lumina incidentă, iar la 50 m, numai 10%.

Zonele mai puţin iluminate, improprii pentru dezvoltarea algelor sunt populate de bacteriile fototrofe anaerobe, *Rhodospirilalles* (purpurii) şi *Chlorobiales* (verzi). Ele fac fotosinteză anoxigenică, utilizând H_2S şi diferiţi compuşi organici ca donori de H_2, folosind cantităţi foarte mici de lumină.

Microorganismele fototrofe mobile îşi pot regla poziţia în coloana de apă, datorită fenomenelor de fototaxie, în funcţie de intensitatea luminii.

Lumina intensă poate produce efecte inhibitorii sau chiar distructive (prin fotooxidare) asupra microorganismelor din straturile superficiale ale apelor. Aceste efecte ar explica numărul redus de bacterii la suprafaţa apelor oceanice clare. Microorganismele care conţin pigmenţi carotenoizi sunt protejate de efectele dăunătoare ale radiaţiilor.

Temperatura, alături de oligotrofie, este răspunzătoare de încetinirea activităţilor metabolice. Temperatura apei mării, la suprafaţă, se apropie de 28°C la tropice şi de punctul de îngheţ în regiunile polare.

În funcţie de nivelul termic s-a produs o zonare ecologică a apelor: termenul de *psihrosferă* desemnează regiunile cu temperaturi mai mici de 10°C, iar cel de *termosferă* cuprinde regiunile mai calde.

Mediul marin este populat de microorganisme psihrofile, care cresc lent pe medii nutritive la 0-5°C, dar se dezvoltă mai repede la 20-25°C.

Presiunea hidrostatică creşte linear cu adâncimea (1 atm. la fiecare 10 m) şi influenţează natura microorganismelor şi procesele biologice din mediul marin. Presiunea hidrostatică influenţează proprietăţile fizico-chimice ale apei, modificându-i gradul de ionizare, pH-ul şi vâscozitatea. Ea influenţează solubilitatea şi viteza de transport a nutrienţilor prin membranele celulare, cinetica enzimatică, structurile terţiară şi cuaternară ale proteinelor şi morfologia bacteriilor. Microorganismele alohtone nu se pot dezvolta sub 200 m. Bacteriile din marile abisuri (la 500 m adâncime) nu cresc la presiuni mai mici de 350 atm, creşterea optimă fiind la 690 atm.

Barofilia este frecvent asociată cu copiotrofia. Microorganismele barofile sunt abundente în habitatele bogate în nutrienţi ca, de exemplu, proveniţi din dejecţiile animalelor marine, din carcasele lor în curs de descompunere, unde au un avantaj competitiv faţă de mediul acvatic oligotrof. Din punct de vedere ecologic, fenomenul este avantajos pentru că măreşte rata degradării substanţelor organice din adâncuri, a căror conversie până la mineralizarea completă este asigurată de microorganismele oligotrofe.

Turbiditatea apei este determinată de materia particulată vie şi nevie aflată în suspensie şi care determină formarea sedimentelor. Turbiditatea condiţionează adâncimea până la care radiaţiile solare pot asigura procesul de fotosinteză.

Curenţii determină importante efecte ecologice ale apelor. În funcţie de prezenţa sau de absenţa lor, mediile acvatice se împart în curgătoare (izvoare, râuri, fluvii) sau stătătoare (stagnante), cum sunt lacurile, bălţile, mările şi oceanele. De fapt, apele "stătătoare" sunt expuse unor curenţi verticali şi orizontali care mobilizează masele de apă. Curenţii produc amestecul unor mase importante de apă, amestecul nutrienţilor şi o redistribuire a microbiotei.

Gazele dizolvate şi valoarea pH. Bazinele acvatice naturale conţin cantităţi mici de gaze dizolvate, în special CO_2, O_2, N_2 şi în condiţii speciale, H_2, CO, H_2S, etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CO_2 îşi are originea în atmosferă şi în respiraţia organismelor acvatice. Este necesar pentru fotosinteză, pentru metabolismul de biosinteză al microorganismelor chemoautotrofe. Concentraţia CO_2 creşte cu adâncimea. Variaţiile concentraţiei de CO_2 se corelează cu valorile pH ale apelor naturale. CO_2 se poate găsi în stare liberă, sub formă de H_2CO_3, bicarbonat (HCO_3^-) şi carbonat (CO_3^{2-}).

O_2 provine din atmosferă sau este produs prin fotosinteza oxigenică a algelor şi cianobacteriilor. Concentraţia sa este mai mare în apele curgătoare şi scade în raport cu adâncimea, în apele lente şi stagnante. Diminuarea este netă în apele cu încărcătură organică mare. În lacurile adânci, ca şi în mări, concentraţia O_2 se corelează invers cu cea a CO_2.

Cu excepţia bazinelor relativ închise (Marea Neagră, etc), apele din adâncul mării, ca şi straturile superioare ale celor mai multe sedimente sunt oxigenate.

Sedimentele marine prezintă o a doua zonare a concentraţiei O_2. La suprafaţa lor, concentraţia relativ mare de O_2 este asociată cu prezenţa nitraţilor, a Fe feric şi cu o concentraţie mică de CO_2.

Aceşti parametri se modifică progresiv cu adâncimea, astfel cât, după zona intermediară de tranziţie se instalează o zonă de anaerobioză fundamental modificată: dispariţia O_2, conversia CO_2 la CH_4, a nitraţilor şi nitriţilor la NH_4^+ şi a Fe^{3+} la Fe^{2+} (feros). Zona profundă este anaerobă, caracterizată prin acumularea H_2S în concentraţii toxice pentru cele mai multe organisme (deoarece leagă Fe din citocrom oxidază) şi nu poate fi populată decât de bacteriile tolerante la H_2S, care îl folosesc ca sursă de energie (bacteriile sulfuroase chemoautotrofe), H_2S este oxidat şi furnizează potenţialul reducător în fotosinteza anoxigenică.

Salinitatea şi compoziţia ionică sunt caracteristicile care diferenţiază net mediile acvatice dulci de cele marine şi oceanice şi, în consecinţă influenţează natura microorganismelor care le pot popula. Puţine microorganisme sunt comune ambelor tipuri de ape.

Concentraţia medie a sărurilor în apele oceanice este de 3,5% (3,2-3,8%). Concentraţiile extreme de săruri se găsesc în Marea Moartă. În condiţii de iradiere solară intensă, nivelul de salinitate atinge 340 g săruri/l, în special sub formă de NaCl şi $MgCl_2$.

Salinitatea apelor oceanului este relativ constantă. Fac excepţie mările interioare, care în zona estuarelor suferă un proces de diluţie amplă, la gura marilor afluenţi, cu formarea unui gradient de salinitate la interfaţa apelor dulci cu cele marine.

Aproximativ 99% din sărurile dizolvate sunt formate prin combinarea a 10-12 ioni anorganici majori (Cl^-, Na^+, Mg^{2+}, K^+, SO_4^{2-}, HCO_3^-, CO_3^{2-}), cărora li se adaugă Fe, Mn, Cu, Zn, Mb.

Comportamentul microorganismelor în mediul salin

Microorganismele provenite din apele dulci sunt *halofobe*. După ce sunt transferate în mediul salin, rezistă o perioadă scurtă de timp, după care mor.

Cele *halotolerante*, în special cele eurihaline, supravieţuiesc, dar se dezvoltă mai lent decât în mediul lor natural.

Cele *halofile*, autohtone în mediul salin nu se dezvoltă în apă dulce. Ele preferă o salinitate optimă de 2,5-4%. Majoritatea microorganismelor halofile nu au nevoie de o presiune osmotică crescută a mediului, ci unele au nevoie absolută de Na^+, iar altele de Cl^-.

Unele microorganisme (fungi, microalge-*Dunaliella*) realizează o echilibrare a mediului intern, în raport cu cel extern prin acumularea de K^+, paralel cu excluderea Na^+. Alte microorganisme realizează acest echilibru prin acumularea unor osmoregulatori organici ca prolina, glucidele simple, poliolii (glicerina, manitolul, glucozil-glicerolul) sau betaina ($C_5H_{11}NO_2$).

Devierea de la salinitatea optimă are consecinţe negative asupra bacteriilor, determinând modificări morfologice sau fiziologice. Celulele cocoide şi cele bacilare devin filamentoase, iar durata unei generaţii este prelungită. Creşterea salinităţii interferă cu mecanismul diviziunii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Analizând halofilia în lumea microorganismelor, Stewart (1983) ajunge la concluzia că această proprietate este, cel mai adesea, asociată cu capacitatea de utilizare a energiei solare şi de fixare a CO_2 prin fotosinteză. Halofilia este frecvent întâlnită la alge, cianobacterii şi la bacteriile care fac fotosinteză anoxigenică (*Anoxybacteria*). Aceasta demonstrează capacitatea microorganismelor fotoautotrofe de a se adapta cel mai bine la concentraţiile ionice mari şi de a realiza un echilibru osmotic într-un mediu în care ele sunt producători primari.

Bacteriile chemoheterotrofe marine autohtone sunt reprezentate de 4 genuri: *Vibrio, Alteromonas, Alcaligenes* şi *Pseudomonas* (Bauman, 1981). Salinitatea apelor marine influenţează densitatea apei, determinând o temperatură de îngheţ mai scăzută.

Apele dulci au o salinitate foarte redusă. Compoziţia lor ionică este diferită, fiind reprezentată, în special, de Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, în bicarbonat (HCO_3^-), SO_4^{2-} şi Cl^-.

Oligotrofia

Capacitatea microorganismelor acvatice de a dezvolta în medii cu concentraţii minime de substanţe organice a fost descrisă de Zobell (1943). Conceptul de oligotrofie are o importanţă ecologică deosebită şi este definit de capacitatea microorganismelor de a creşte cu o rată mare, la concentraţii mici de substanţe organice. Această proprietate le permite să domine în comunităţile bacteriene naturale din bazinele acvatice.

Kuznetsov (1979) precizează că atributul de oligotrof se atribuie bacteriilor acvatice care se dezvoltă la *prima cultivare, in vitro*, pe medii cu un conţinut de 1-15 mg C organic dizolvat la litru şi care cresc pe aceste medii şi în recultivările ulterioare, deşi se pot adapta şi la medii cu concentraţii mai mari de substanţe organice.

Kuznetsov (1979) propune gruparea bacteriilor oligotrofe în patru grupuri, în funcţie de răspunsul lor faţă de substanţele organice din mediu:

1) Organisme care se dezvoltă la prima cultivare pe apa sterilizată provenită din mediul studiat, dar nu se mai dezvoltă în recultivările ulterioare nici pe medii sărace şi nici pe medii bogate. Aceste bacterii nu s-au identificat, fiind cunoscute numai pe baza morfologiei la microscopul electronic.

2) Microorganisme care după cultivarea în apa testată (sterilizată în prealabil) şi transferate pe medii bogate, cresc lent sau deloc. Ele încep să se dezvolte bine pe medii bogate în nutrienţi, după recultivare pe apă sterilă sau mediu agarizat, sărac în substanţe organice.

3) Bacterii izolate pe medii speciale, în principal sărace, sau chiar prin metode speciale de izolare.

4) Bacterii studiate la microscopul electronic, dar încă nu au fost cultivate pe medii artificiale.

Bacteriile oligotrofe înglobează cu mare eficienţă nutrienţii prezenţi în concentraţii minime în mediu. Ele posedă structuri specializate, cum este prosteca, reprezentând un avantaj adaptativ important pentru fixarea pe diferite substraturi, dar şi pentru mărirea suprafeţei de absorbţie.

Durata unei generaţii, în cazul bacteriilor oligotrofe, este de 4-8 ore. Incapacitatea lor de a se dezvolta pe medii bogate în nutrienţi, s-ar datora, probabil, producerii unor metaboliţi toxici. Majoritatea microorganismelor oligotrofe produc H_2O_2, dar nu au catalază pentru a o degrada. Importanţa acestui mecanism este demonstrată de faptul că ele se pot dezvolta pe medii bogate, suplimentate cu catalază. Probabil că microorganismele oligotrofe se dezvoltă în asociaţie cu organismele copiotrofe producătoare de catalază.

Microbiota apelor curgătoare

Bazinele naturale cu apă dulce (ape curgătoare sau lacuri) prezintă diferenţe fizice şi chimice atât de mari, încât creează o varietate enormă de condiţii ecologice, care fac ca, practic, să nu existe două ape identice. În cazul apelor curgătoare, a lacurilor mici şi în zona malurilor,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

situaţia este complicată de influenţa solului prin eroziune, de resturile vegetale şi animale, etc. Microorganismele alohtone supravieţuiesc numai temporar. Deoarece solul este un mediu relativ bogat în nutrienţi, supravieţuiesc numai microorganismele capabile să se adapteze la condiţiile oligotrofe din mediul acvatic. Ca urmare, stabilirea unor coordonate privind numărul, diversitatea pe grupe de organisme (bacterii, microfungi, microalge, protozoare) sau pe grupe fiziologice, este lipsită de orice semnificaţie.

Izvoarele sunt medii acvatice formate prin apariţia la suprafaţa terestră, a apelor subterane. Diferă foarte mult ca debit, temperatură şi compoziţie chimică. În apropiere de sursă, sunt oligotrofe. Microbiota este foarte redusă şi formată din microorganisme provenite din apele freatice sau "spălate" din straturile subterane în trecerea spre suprafaţă. Sunt prezente în special bacterii Gram negative (*Pseudomonas*) şi forme prostecate (*Hiphomicrobium, Caulobacter*, etc).

Izvoarele minerale au un conţinut ridicat de săruri minerale dizolvate de apele care străbat diferitele formaţiuni geologice. Izvoarele care conţin compuşi ai Fe sunt populate de ferobacterii *(Gallionella, Leptothrix)*.

Izvoarele termale îşi au originea în solurile vulcanice şi provin, în general, de la adâncimi mari. Au temperaturi de peste 50°C, care permit numai dezvoltarea organismelor procariote. Pot fi izvoare acide (bogate în H_2CO_3) sau sărate (cu săruri de Mg, Fe sau S).

Râurile prezintă un număr mare de factori variabili (viteza de curgere, debitul, adâncimea, conţinutul mineral). Mărimea deosebită a interfeţei cu litosfera de-a lungul malurilor, determină fenomene de eroziune, de îmbogăţire cu substanţe minerale şi organice din sol, de la cele mai simple până la acizii humici, precum şi cu microorganisme alohtone.

Cursul superior este mai pur şi mai clar, cu grad ridicat de oxigenare, rapid, temperatură scăzută şi productivitate primară redusă. În cursul mijlociu încep să se manifeste influenţe antropogene. Cursul inferior este lent, cu turbiditate crescută şi depunere de sedimente, putând fi poluat cu îngrăşăminte, pesticide, cu ape uzate orăşeneşti sau industriale, cu metale grele, cu numeroşi compuşi toxici, etc.

După gradul de poluare pot exista trei tipuri majore:

1) *ape oligosaprobe*, cu conţinut redus de substanţă organică şi concentraţie mare de O_2;

2) *ape mezosaprobe*, având un grad mediu de poluare şi cu diminuarea concentraţiei de O_2;

3) *ape polisaprobe*, cu o foarte mare concentraţie de materie organică şi cu concentraţie redusă sau chiar absentă de O_2.

Microbiota râurilor este heterogenă, în funcţie de condiţiile locale. Microorganismele autohtone se adaugă celor alohtone provenite din sol şi din diferite surse de contaminare. Cele alohtone au o existenţă efemeră, datorită incapacităţii de adaptare la condiţia oligotrofă (râurile curate), la efectele radiaţiilor UV şi ale competiţiei bacteriofagilor şi protozoarelor bacteriovore.

Lacurile sunt bazine acvatice stagnante, localizate în depresiuni ale scoarţei terestre cu origine tectonică, vulcanică, glacială sau clastocarstică. În funcţie de concentraţia sărurilor pe care le conţin, se disting lacuri cu apă dulce, salmastră sau sărată. Adâncimea este variabilă (de la câţiva metri până peste 1000 -Lacul Baikal, 1741 m).

Pe baza gradului de troficitate se disting:

- lacurile *oligotrofe* sunt adânci, cu o concentraţie mică de nutrienţi minerali şi au productivitate primară redusă;

- lacurile *eutrofe* sunt mai puţin adânci şi conţin apă eutrofă (bogată în nutrienţi). Conţin un mare număr de organisme saprobionte. Au o productivitate mare în stratul superior, iluminat, al coloanei de apă. Fitoplanctonul se dezvoltă rapid. După moarte, componentele se depun şi sunt descompuse de microorganisme, cu un consum mare de O_2. Final, microorganismele aerobe sunt înlocuite cu cele anaerobe, de bacteriile sulfat-reducătoare şi de cele sulfuroase incolore. Se acumulează H_2S. Toamna, când datorită reducerii temperaturii are loc circulaţia apei, izbucnesc "înfloriri" planctonice;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- apele *distrofice* sunt ape dulci, care conţin o mare cantitate de substanţe organice dizolvate, coloizi şi fragmente de ţesuturi vegetale, de provenienţă predominant alohtonă.

Lacurile cu *apă dulce* au o microbiotă foarte heterogenă, care include practic toate categoriile de microorganisme: eubacterii, actinomicete, cianobacterii, microfungi, microalge şi protozoare.

Lacurile *sărate* sunt caracterizate printr-o salinitate foarte diferită, ajungând chiar până la saturare, cu formarea de precipitate pe maluri, în regiunile cu evaporare mare, datorită temperaturii ridicate. Ele pot conţine NaCl, $MgCl_2$, $NaHCO_3$, borax ($Na_2Br_4O_7$) sau $MgSO_4$ (lacurile "amare"). Lacurile sărate sunt populate de un număr limitat de bacterii halotolerante şi în special halofile (optimum de salinitate 20-30%), care conţin frecvent vacuole cu gaze ce le permit modificarea compoziţiei pe verticală şi pigmenţi carotenoizi cu rol protector faţă de intensitatea prea mare a luminii solare, care le colorează coloniile în roşu sau oranj strălucitor.

Habitate şi comunităţi specifice microbiotei acvatice

Comunităţile de microorganisme ocupă diferite habitate care prezintă condiţii adecvate pentru creşterea şi multiplicarea lor. Comunităţile de organisme prezente în straturile superioare ale apei sunt reprezentate de *neuston* şi *plancton*.

Neustonul (gr. *neuo* = a aluneca) este o comunitate complexă formată din eubacterii, cianobacterii, alge, microfungi şi protozoare, dezvoltată ca un monostrat sau ca un microstrat la interfaţa apă/aer. Este un habitat foarte aerat, intens luminat şi supus la fluctuaţii rapide ale temperaturii.

Este alcătuit din *epineuston*, respectiv din organisme care trăiesc în filmul de la suprafaţa apei şi din *hiponeuston*, organisme care trăiesc imediat sub suprafaţă.

La nivelul neustonului are loc o concentrare masivă de nutrienţi minerali şi organici (în special, lipide), datorită acumulării lor din masa acvatică şi din aer, din cauza tensiunii superficiale ridicate.

Neustonul se comportă ca un substrat solid pe care se pot dezvolta numeroase bacterii (câteva milioane/cm^2) aderente.

Planctonul (gr. *planktos* = care călătoreşte) este reprezentat de organisme a căror distribuţie este dependentă de mişcarea apei sau a aerului.

Planctonul are cea mai mare densitate în zona aerobă, în care în special fitoplanctonul se dezvoltă intens, realizând producţia primară de materie organică a bazinului acvatic.

Bentosul (gr. *benthos* = adâncul mării) este reprezentat de organisme ataşate de sau trăind pe sau aproape de fundul apei, adică la interfaţa dintre hidrosferă sau litosferă reprezentată de sedimente.

Sedimentul bentonic este un mediu foarte favorabil pentru dezvoltarea microorganismelor. Aerob la suprafaţă şi progresiv anaerob în adâncime, permite dezvoltarea masivă a producătorilor secundari, care folosesc compuşii organici depuşi din coloana supraiacentă.

Pleustonul (gr. *pleo* = a înota, a naviga) este un termen folosit în două accepţiuni. După Lincoln (1982), pleustonul reprezintă totalitatea organismelor acvatice care rămân în permanenţă la suprafaţa apei prin propria lor capacitate de plutire. În mod normal, sunt parţial imersate în apă şi parţial în contact direct cu aerul. Include macrofitele plutitoare. După Cheng (1975), pleustonul este un habitat situat la interfaţa dintre mare şi aer, incluzând bacterii, microfungi, microalge şi protozoare, reprezentând echivalentul marin al neustonului.

Marea ca mediu natural pentru microorganisme

Mediul marin este unic prin suprafaţa şi volumul foarte mare, conţinutul scăzut în nutrienţi organici, salinitatea relativ mare şi conţinutul ionic ridicat, temperatura scăzută şi un gradient presional în funcţie de adâncime. Mediul marin ocupă 70,8% din suprafaţa planetei. Aproximativ 97,6% din volumul total al apei marine este cuprins oceane şi 88% din suprafaţa lor are adâncimi de peste 1000 m.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Zonarea ecologică a mediului marin

Mediul marin este divizat convenţional, în domenii, zone şi subzone, pe baza a două criterii majore: adâncimea şi mediul bentic (fundul mării) după cum urmează:

1) Coloana de apă este divizată în domeniile *neritic* (cu adâncime mai mică de 200 m) şi *oceanic* sau *pelagic* (de la marginea platformei continentale, în larg).

2) Regiunea de fund (bentică) este divizată în zonele: *litorală, sublitorală, batială, abisală* şi *hadală.*

Domeniul *neritic* (gr. *nerites* = cochilie marină) corespunde zonei marine de mică adâncime, situată deasupra platformei continentale. Microbiota este dominată de microalge, microorganisme chimioautotrofe şi heterotrofe, aerobe şi facultativ anaerobe.

Domeniul *oceanic* corespunde coloanei de apă situată în largul mării, dincolo de platforma continentală.

Zona *litorală* reprezintă interfaţa dintre ecosfera marină şi litosferă. Predominantă este acţiunea de eroziune, spălare şi solubilizare a substanţelor minerale şi transportul lor în mare. Microbiota dominantă este cea caracteristică solului.

Zona *sublitorală* se întinde de la limita inferioară, cea mai joasă a zonei litorale, până la marginea platformei continentale (200 m adâncime).

Zona *bathială* (gr. *bathos* = adânc) corespunde regiunii de fund a oceanului, între adâncimile de 200 şi 4000 m. Include panta continentală, unde adâncimea scade rapid.

Zona *abisală* (gr. *abissos* = fără fund), situată tre 4000 şi 6000 m, include zonele de activitate microbiochimică şi geochimică.

Zona *hadală* (*Hades*, zeul infernului mitologia greacă) include zonele mai adânci de 6000 m.

Microbiota marină

Este alcătuită din trei categorii de microorganisme:

1) *autohtone* sau permanente, adaptate la condiţiile specifice mediului marin. Sunt caracteristice pentru largul oceanului şi sedimente;

2) *alohtone*, temporare sau contaminante, provenite din sol, afluenţi, canale sau ambarcaţiuni. Sunt mai frecvente în zonele litorale şi supravieţuiesc puţin în mediul marin;

3) *ubicvitare*, comune solului şi mediului marin (exemplu, *Welchia perfringes*).

Bacteriile marine cresc optim la concentraţia sărurilor de 33-35‰, nu se dezvoltă sau se dezvoltă slab în absenţa NaCl, sunt oligotrofe, psihrofile, cu excepţia celor din apele tropicale de suprafaţă. În funcţie de habitat sunt barofobe (la suprafaţa apei), barotolerante sau barofile. Cele care trăiesc la suprafaţă, sunt frecvent cromogene (60-70%). Coloniile se colorează în galben, portocaliu, brun, verde, roşu negru etc. Pigmenţii au rol protector faţă de efectul nociv al luminii. Majoritatea (80-95%) sunt Gram negative, mobile, aerobe, facultativ anaerobe, iar cele din adâncul sedimentelor sunt obligat anaerobe. Pot fi fototrofe, chemoautotrofe şi heterotrofe.

Rolul lor funcţional este ilustrat de diversitatea grupelor fiziologice: amonificatori, nitrit- şi nitrat-bacterii, denitrificatori, sulf-oxidante şi sulfat-reducătoare, ferobacterii, proteolitice, fermentative, chtinolitice, celulozolitice, lipoclastice etc. şi uneori, patogene pentru diferite animale marine. Speciile cel mai frecvent întâlnite aparţin genurilor: *Achromabacter, Alcaliganes, Alteromonas, Bacillus, Corynebacterium, Cytophaga, Flavobacterium, Hyphomicrobium, Micrococcus, Nocardia, Pseudomonas, Sarcina, Spirillum, Vibrio, Streptomyces* etc.

Numărul lor real este greu de estimat deoarece, bacteriile provenite din adânc îşi pierd capacitatea de multiplicare, ori se pot liza datorită modificărilor de temperatură şi presiune ori sunt asociate cu diferite suprafeţe inerte sau vii, unde găsesc condiţii mai bune decât în mediul oligotrof. Numărul bacteriilor, în general, este maxim în regiunile litorale, în estuare şi scade

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

progresiv în zonele pelagice, odată cu adâncimea şi cu depărtarea de ţărm. În primii câţiva cm ai sedimentelor marine, pot ajunge la 10^7-10^8 celule/g. Scade mult în profunzimea nutrienţilor datorită anaerobiozei şi lipsei nutrienţilor.

Cianobacteriile marine sunt răspândite ubicvitar, dar numărul speciilor autohtone pare a fi mic (*Trichdesmium, Derniocarpa*). Foarte multe specii sunt halotolerante, iar unele (*Anabaena flosaquae, Nodularia spumigena*) produc înfloriri în zonele eutrofizate.

Fungii marini sunt reprezentaţi de forme autohtone, halofile sau de specii halotolerante terestre sau limnetice. Levurile sunt reprezentate de circa 200 de specii: *Candida, Saccharomyces, Torulopsis* etc.

Algele marine sunt producători primari, cu importanţă fundamentală pentru existenţa vieţii în mediul marin. Ele formează *fitoplanctonul,* cu densitate maximă în stratul superior al zonei eufotice. Imensa lor majoritate sunt fotoautotrofe, dar unele cresc şi heterotrof la întuneric, prin asimilarea unor substanţe organice (glucide, acizi organici etc). Altele nu cresc la întuneric, dar creşterea lor la lumină poate fi accelerată de prezenţa substanţelor organice (fac fotoasimilare).

Cei mai importanţi producători primari sunt *Chlorophyta (Dunaliella euchlora, Chlorela sp., Clamydomonas, Chlorococcus), Diatomeae (Cyclotella, Melosira sp., Nitzschia brevirostris*, etc.), *Dinoflagellatae, Chrysomonadaceae şi Cryptophyceae*. Se adaugă numeroase specii de *Rhodophyceae* şi *Euglenophyta.*

Algele brune *(Phaeophycophyta*) reprezentând 1500 de specii se dezvoltă în apele tropicale clare, până la adâncimea de 200 m.

Protozoarele marine sunt flagelate, rizopode şi ciliate, componente ale zooplanctonului. Cele autohtone au un grad important de halofilie. Cel mai important constituient al zooplanctonului marin sunt flagelatele *Cocolithophoridae*, la care se adaugă specii de *Acantharia* şi *Tintinnidium* şi, în special *radiolari,* care se găsesc între 350-5000 m.

Microorganismele din adâncuri se caracterizează prin ritmul lent al activităţii metabolice, datorită disponibilităţii reduse a nutrienţilor, presiunii hidrostatice crescânde în raport cu adâncimea şi temperaturii scăzute a mediului ambiant.

Pe baza unor experienţe *in situ*, Jannasch şi Wirsen (1977) au demonstrat că la adâncimea de 5300 m, nutrienţii sunt degradaţi cu o viteză de 100 de ori mai mică decât la aceeaşi temperatură la suprafaţă. Timpul de generaţie a bacteriilor la 5500 m este de 210 ore. Presiunea ridicată influenţează etapa iniţială de legare a nutrienţilor de membrana bacteriilor, transportul intracelular, biosinteza proteinelor şi activitatea respiratorie. Dacă bacteriile ar funcţiona cu particularităţile lor metabolice "normale", ar utiliza întreaga energie şi ar determina moartea prin înfometare a tuturor organismelor din ecosistemul marin.

În mediul marin, în absenţa totală a plantelor verzi, funcţia de *producător primar* revine integral algelor şi bacteriilor fototrofe. Producţia netă de materie organică prin fotosinteză variază în funcţie de temperatura apei, de concentraţia nutrienţilor etc. şi ar fi între 0,03-10° C organic/m^2/zi.

Degradarea substanţelor organice în ocean

Se apreciază (Jannasch şi Taylor, 1984) că 90-95% din totalul substanţelor organice, produse prin fotosinteză sunt degradate şi reciclate în stratul superior, respectiv cei 100-300 m de la suprafaţa oceanului. Acest proces afectează, practic, totalitatea carbonului organic dizolvat (DOC) şi o parte din cel prezent în formă particulată (POC). Restul de 5-10% sunt materiale organice prezente sub formă de particule, este depus prin sedimentare spre fundul oceanului, cu o viteză care depinde în primul rând de densitatea şi dimensiunea particulei.

Viteza teoretică de depunere a fitoplanctonului, ca şi a agregatelor de particule floculate, care constituie "zăpada marină" este apreciată la 0,1-1 m/zi, sau 1-50 ani pentru adâncimea de 5000 m.

Un aport cu totul deosebit de C organic particulat este cel reprezentat de reziduuri fecale provenite de la zooplancton, care sedimentează cu o viteză de 50-200 m/zi sau de la necton (până la 2700 m/zi).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Se apreciază că numai 1% din totalul C organic produs prin fotosinteză ajunge pe fundul oceanului. Cel mai puţin degradate sunt fragmentele de ţesuturi sau particule mari, ce ajung ca atare pe fundul oceanului şi la acest nivel sau pe parcurs sunt detectate şi capturate de animalele mari.

O situaţie specială o are "ploaia" de particule fecale provenite de la zooplancton care sedimentează, învelite fiind de un strat de mucus, populat de numeroase bacterii ce se multiplică, utilizând materialele nedigerate de zooplancton. Pe parcursul sedimentării lor până la fundul oceanului, aceste particule pot fi ingerate de mai multe ori de animalele marine. Fecalele care ajung pe fundul oceanului, devin o sursă de materie organică disponibilă pentru animalele mici, imobile şi pentru microorganismele din sedimente. Celulele microorganismelor sunt depuse la fundul mărilor sub formă de celule moarte nelizate (datorită inactivării enzimelor în condiţiile temperaturii scăzute şi a presiunii ridicate), în stare de latenţă, sau de celule "înfometate", cu metabolism foarte atenuat. Nutrienţii acumulaţi la fundul mării pot fi readuşi la suprafaţă prin curenţi ascendenţi, dar procesul este foarte lent, evaluat la mai multe mii de ani.

Substanţele rezistente la degradare (lignina, resturile celulozice, lipidele) sunt depuse şi se acumulează pe fundul oceanului, unde, împreună cu o serie de compuşi rezultaţi din degradare sau din bioconversie formează *humusul marin*.

Caracteristica fundamentală a apelor adânci şi a sedimentelor organice, ca habitat pentru microorganisme este *oligotrofia*.

Se recunoaşte rolul esenţial al bacteriilor şi al microorganismelor în mineralizarea substanţelor organice, asigurând refacerea nutrienţilor necesari creşterii plantelor. Mineralizarea completă este atinsă numai în prezenţa O_2. În anaerobioză, degradarea substraturilor este incompletă.

O funcţie deosebit de importantă a bacteriilor este aceea de conversie a materiei organice dizolvate în celulele bacteriene şi reintroducerea acesteia în lanţul trofic sub o formă particulată (biomasă nutritivă), accesibilă animalelor care se hrănesc prin filtrare. Wright şi Hobby (1965) au demonstrat experimental, capacitatea bacteriilor de a îngloba şi asimila compuşii organici dizolvaţi în concentraţii foarte mici, cu o mare eficienţă. Această proprietate le conferă un avantaj selectiv faţă de microalgele heterotrofe în mediile acvatice oligotrofe.

F. ACTIVITATEA GEOLOGICA A MICROORGANISMELOR

Geomicrobiologia sau *litobiologia* este un domeniu al ecologiei microorganismelor, cu caracater interdisciplinar, rezultat din confluenţa unor concepte aparţinând microbiologiei generale, geologiei, ecologiei şi ştiinţelor solului.

Formarea şi degradarea unor minerale, iniţial s-a realizat fără intervenţia microorganismelor. În prezent este demonstrat în mod cert că, după formarea lor, diferite tipuri de roci situate la suprafaţa scoarţei sau aproape de suprafaţă sunt expuse forţelor fizice, chimice şi biologice, care le degradează la particule mici sau la compuşi hidrosolubili.

Geomicrobiologia studiază rolul microorganismelor în transformările substanţelor minerale, în formarea, eliberarea şi migrarea ţiţeiului în zăcământ, precum şi în formarea zăcămintelor de cărbuni.

Transformările microbiene ale mineralelor

Unele microorganisme folosesc direct substanţele minerale, ca surse de energie (donori de electroni sau de hidrogen) sau ca acceptori de electroni sau hidrogen. Nevoia de substanţe minerale este foarte mare când ele sunt utilizate ca sursă de energie.

Unele microorganisme din mediile naturale pot transforma cantităţi mari de substanţe minerale prin două mecanisme diferite:

1) prin acţiune enzimatică directă (oxidare, reducere, hidroliză);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2) pe cale neenzimatică (indirectă), prin acțiunea unor produși finali de metabolism. Pe această cale se pot realiza patru tipuri de interacțiuni: a) *coroziunea* materiei insolubile prin efectul acizilor anorganici (azotic, sulfuric, carbonic) sau acizilor *organici;* b) *precipitarea* carbonaților, a sulfaților și a sulfurilor produse metabolism; c) adsorbția oxizilor de Fe și Mn pe structurile extracelulare a bacteriilor; d) *chelatarea*, reacție prin care un compus organic produs pe cale metabolică poate complexa un ion metalic, protejându-l de precipitare, oxidare sau reducere.

Procesele de transformare ale mineralelor sunt cel mai mult studiate în cazul bacteriilor, dar au loc și sub acțiunea fungilor, a algelor, a protozoarelor, a lichenilor, a unor plante superioare și chiar a unor metazoare.

Transformările microbiene ale fierului și manganului

Fierul, al patrulea element ca abundență în natură este prezent în cea mai mare parte, în forme insolubile, inaccesibile circulației biogeochimice. Ciclul fierului poate fi simplificat la reacții de oxidare ale Fe feros la Fe feric și de reducere a Fe feric la Fe feros.

Reacțiile de oxido-reducere sunt importante atât pentru compușii anorganici, cât și pentru cei organici ai Fe.

Fe^{3+} și Fe^{2+} au solubilități diferite: Fe^{3+} (feric) precipită în mediul alcalin ca hidroxid feric, iar în condiții anaerobe poate fi redus la forma feroasă mai solubilă. In condiții naturale, în habitate aerobe. Fe este prezent în special în stare oxidată (ferică). În anerobioză se acumulează Fe feros.

Bacteriile provenite din medii naturale sau cultivate pe medii cu Fe și Mn, examinate la microscopul electronic, au evidențiat existența depozitelor de Fe și Mn cu localizări selective.

Magnetosomii sunt depuși intracelular, dar compușii cu Fe și Mn pot fi depuși extracelular, la nivelul polimerilor ce formează stratul mucos. Matricea polimerică este impregnată cu metale. Fixarea metalelor ar fi rezultatul unui proces de precipitare nespecifică, ulterior adsorbției fierului coloidal pe grupările acide ale polimerilor.

Pe baza observațiilor privind asocierea frecventă a depozitelor de Fe cu unele structuri celulare și cu polimerii extracelulari, se consideră că depozitarea Fe s-ar putea realiza prin mecanisme biologice, dar și pe cale abiotică.

Oxidarea biologică a Fe^{2+} s-ar realiza în condiții de microaerofilie, la pH 6,6, dar și în apele oligotrofe bine aerate, slab alcaline. După depunerea oxizilor de Fe în matricea polimerică, fenomene de cataliză abiotică ar accelera fenomenele de depunere. Apa care se scurge prin formațiunile de nisip, dizolvă sărurile feroase. Când ajung la suprafață, mecanismele oxidative convertesc Fe^{2+} la Fe^{3+}, care precipită ca hidroxid feric, ce formează depozite brun-ruginii în izvoare, pe suprafața pietrelor în apele care curg lent, ca o peliculă iridescentă de $Fe(OH)_3$.

Autooxidarea are loc rapid în condiții de aerobioză, la pH neutru. Se formează $Fe(OH)_2$ și $Fe(OH)_3$, oxizi încărcați pozitiv, care se pot lega de polimerii bacterieni electronegativi.

Datorită O_2 atmosferic, cel mai mult Fe din biosferă este în stare oxidată (Fe^{3+}). Reducerea Fe feric (Fe^{3+}) la Fe^{2+} este rezultatul activității bacteriilor heterotrofe din g. *Alcaligenes, Bacillus*, *Proteus* și *Pseudomonas*, precum și a unor fungi (Mulder, 1972).

Manganul, element esențial pentru toate organismele, se găsește în natură fie în formă redusă (Mn^{2+}), fie în formă oxidată (Mn^{3+}).

Oxidarea ionului manganos (Mn^{2+}) la ion manganic (Mn^{3+} sau Mn^{4+}) se poate realiza pe trei căi:

1) *Calea pur chimică*, realizabilă în anaerobioză, la pH 9,0, cu formare de MnO_2, insolubil în apă.

2) *Oxidarea în prezența hidroxiacizilor* (acid malic, citric, gluconic) este posibilă la pH mai mare de 8,0 și în prezența unor concentrații mari de Mn. Mecanismul ei nu exclude intervenția unor microorganisme.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3) *Oxidarea biologică* este realizată de *manganobacterii* şi de unii fungi: *Leptothrix* sp., *Gallionella, Hyphomicrobium, Sphaerotilus, Metallogenium*, etc. Reacţia după care bacteriile şi fungii ar oxida Mn^{2+} este:

$$Mn^{2+} + 1/2\ O_2 \rightarrow MnO_2 + 2H^+$$

Oxidarea s-ar produce pe suprafaţa celulelor bacteriene sub acţiunea oxidazelor sau a catalazelor, fără beneficiu pentru microorganisme.

Microorganismele se pare că au rol important în geneza nodulilor de Mn. Nodulii sunt concreţiuni minerale, bogate în oxizi de Fe şi Mn, prezenţi pe fundul mărilor şi oceanelor. Pot conţine până la 65% MnO_2. Mărimea lor variază între 1 mm şi 20 cm diametru. Microorganismele ar constitui suprastructura solidă pe care s-ar acumula oxizii de Fe şi Mn.

Recuperarea metalelor prin acumulare de către microorganisme

Capacitatea microorganismelor acvatice de a concentra ionii metalici din soluţiile lor diluate prin adsorbţie sau absorbţie directă din apă a fost demonstrată de Riley (1965) şi este consecinţa proprietăţii de a fixa şi precipita intracelular sau pe suprafaţa lor, metalele din soluţie. În prima etapă are loc interacţiunea stoichiometrică a metalului din soluţie cu grupările chimice reactive de pe suprafaţa peptidoglicanului. Ulterior, după complexare, situsurile respective devin "centre de nucleare", la nivelul cărora continuă procesul de depunere a metalului sub formă de precipitate chimice.

Se admite existenţa a două modalităţi majore de bioacumulare:

1) complexarea metalelor cu sarcini electropozitive, la grupările funcţionale electronegative ale suprafeţei celulare sau ale polimerilor extracelulari;

2) acumularea metalelor în citoplasma microorganismelor. Ambele modalităţi au fost demonstrate atât în variantele lor "active", prin intervenţia celulelor vii, cât şi "pasive", adică în prezenţa celulelor moarte.

Procesele active de acumulare a metalelor sunt asociate cu celulele vii şi au la bază interacţiunile cu suprafaţa celulelor, reacţii de oxido-reducere, de schimb ionic, de precipitare, de înglobare intracelulară. Procesele de acumulare se realizează prin următoarele mecanisme:

1) *Reducerea metalelor* de către microorganisme, ceea ce implică o diminuare a valenţei lor. Este cel mai bine cunoscut cazul reducerii Hg. Ionul mercuric (Hg^{2+}) este înglobat de un sistem de transport activ şi este redus de reductaza mercurică la Hg^0, care difuzează din celulă în faza apoasă, fiind pierdut prin volatilizare. Ionii de Fe feric acţionează ca acceptori de electroni şi sunt reduşi în condiţii de microaerofilie sau anaerobioză. Oxizii de mangan sunt reduşi sub acţiunea unor produşi de metabolism, iar S^0 este redus la H_2S şi sulfit.

2) *Precipitarea metalelor* sub acţiunea sulfurilor produse de bacteriile sulfat-reducătoare. *Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* produc H_2S care reacţionează cu cationii metalici liberi sau adsorbiţi, pe care îi precipită sub formă de sulfuri metalice.

3) *Recuperarea argintului* din suspensiile acvatice este un proces foarte eficient, al cărui mecanism nu este precizat.

Acumularea intracelulară a metalelor are loc după un mecanism incomplet elucidat, dar este extrem de rapidă: *Ps. aeruginosa* acumulează 100 mg uraniu per litru de suspensie mai puţin de 10 secunde, iar uraniul ajunge să reprezinte circa 50% din greutatea celulară uscată. Explicaţia fenomenului este următoarea: bacteriile posedă sisteme de transport dependente de temperatură şi energie, necesare preluării din mediu a ionilor de Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^+, Na^+, SO_4^{2-}, etc. Deşi aceste mecanisme sunt foarte selective, nu este exclusă posibilitatea unor substituiri. În consecinţă, anumiţi ioni cu sarcină negativă (CrO_4^{2-}, SeO^{2-}, VO_4^{2-}, WO_4^{2-}, MoO_4^{2-}) pot folosi sistemul de transport al sulfatului (SO_4^{2-}), acumulându-se celulă. În plus, unele microorganisme posedă proteine foarte specifice pentru legarea metalelor. Una dintre ele, *metalotioneina*, conţine numeroşi aminoacizi cu sulf. Prin plierea catenei polipeptidice se formează situsuri active de chelatare, de exemplu, situsuri HS^-. Acţiunea metalotioninei explică posibilitatea cianobacteriei *Synecoccus* de a fixa 1,28 atomi de Cd/moleculă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Depozitarea internă este bine cunoscută la bacteria *Aquaspirillum magnetotacticum*, care include în structura sa *magnetosomi* alcătuiți din magnetită (FeO_4). Magnetosomii sunt acoperiți de o membrană, asemănătoare ca structură chimică, celorlate membrane celulare.

Procesele pasive de acumulare a metalelor (biosorbția) sunt consecința sarcinii electronegative nete a celulelor bacteriene. Polizaharidele capsulare au o sarcină netă negativă. Astfel, biosorbția descrisă de Brierley (1990) este rezultatul atracției electrostatice dintre cationii metalici și situsurile anionice ale suprafeței bacteriene. Pe această cale, ionii de fosfat (PO_4^{3-}), carboxil ($R\text{-}COO^-$), hidroxil (HO^-) și sulfhidril (HS^-) "adsorb" ioni metalici electropozitivi, rapid și reversibil, independent de temperatură și de metabolismul energetic.

Descoperirea fenomenelor de bioacumulare a deschis calea unor biotehnologii menite să asigure depărtarea metalelor (Cu, Cr, Al, Ni, Fe, U, Pb, Cd) din apele uzate industriale. Procedeul poate fi folosit pentru combaterea poluării, refacerea apelor de suprafață sau freatice contaminate, precum și pentru recuperarea metalelor respective, cu consecințe economice importante.

Biosorbanții produși în prezent sunt reprezentați de granule de biomasă microbiană sau de polimeri (exopolizaharide sau componente ale peretelui celular). Ei sunt compactați într-o masă rezistentă la influențele mediului conjurător, cu forme și dimensiuni adecvate, precum și cu capacitate de regenerare.

Biosorbanții leagă metalele prin reacții de schimb ionic, prin precipitare consecutivă fenomenului de nucleare amorsat de metalul legat inițial și prin complexare. Rolul lor este asemănător cu al rășinilor schimbătoare de ioni, dar capacitatea de legare a complexelor metalice este mult mai mare decât a acestora. După desorbția metalelor legate, biosorbanții pot fi refolosiți în mod repetat. Pentru producerea lor poate fi folosită biomasa microbiană rămasă neutilizată de la alte biotehnologii (producție de antibiotice, fermentații etc).

Biosorbanții se folosesc în special pentru depărtarea cationilor metalelor grele din apele uzate, în special Cd, Cu, Pb și Zn.

Rolul microorganismelor în formarea zăcămintelor de petrol

Petrolul (latin, *petra* = rocă, *oleum* = ulei) este un amestec complex, extrem de heterogen, de hidrocarburi gazoase, lichide și solide, la care se adaugă numeroși compuși ai carbonului și hidrogenului cu O, N, S, P.

După ZoBell (1963), proporția diferitelor elemente este următoarea: C - 82,2-87,1%; H - 11,7-14,7%; S - 0,1-5,5%; N - 0,1-1,5%; O - 0,1-4,5%; săruri minerale - 0,1-1,2%.

Teoriile asupra genezei petrolului nu au explicat caracterul reacțiilor chimice din care a rezultat complexul ce conține mii de hidrocarburi.

În prezent există un acord general asupra faptului că petrolul s-a format ca și cărbunele din materia organică supusă unor condiții speciale de mediu și continuă să se formeze și în prezent.

Sursa de bază pentru formarea combustibililor fosili este reprezentată de plantele superioare în mediul terestru, iar în mediul acvatic, furnizorul de biomasă este fitoplanctonul alcătuit de diatomee, dinoflagelate și unele *Chrysophyceae*, în special cocolitoforidele. Se adaugă resturile organice provenite din lanțul trofic complex al mediului acvatic (din zooplancton, animale marine, microorganisme).

Formarea petrolului, la temperaturi și presiuni moderate ar avea loc în două etape: una inițială, *biologică*, în cursul căreia masa organică este atacată și modificată de bacterii și o a doua, foarte îndelungată, de transformări fizico-chimice.

În favoarea participării microorganismelor la formarea zăcămintelor pledează mai multe argumente:

- petrolul este absent în formațiunile geologice pur anorganice;
- în zăcăminte a fost evidențiată frecvent, prezența unor microfosile de animale marine, fragmente de lemn pietrificat, crustacee mici, spori fungici, rășini vegetale, etc;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- prezența în zăcămintele de mare adâncime (2000-2950 m) a unor bacterii pentru creştere necesită temperaturi şi presiuni mari;

- unele bacterii, în condiții artificiale sintetizează unele hidrocarburi simple;

- prezența, în special în fracțiunile grele ale petrolului, a unor "molecule chimice fosile" provenite din organismele vii: alcani de tipul $C_{15}H_{32}$ (probabil originari din alge), alcani de tipul $C_{29}H_{60}$ (originari, se pare din plante superioare), acid cholanic (de origine animală) etc.

Etapele genezei petrolului

Bacteriile acționează în mod cert asupra materiei organice precursoare, pentru a o transforma într-un produs care seamănă mai mult cu petrolul decât cu materialul original, *protopetrol.* Stadiile finale de conversie a protopetrolului în țiței brut sunt de natură fizico-chimică.

Faza inițială - biologică corespunde transformării constituienților majori (glucide, proteine, lipide) din structura organismelor moarte, sub acțiunea bacteriilor. Inițial, acționează bacteriile facultativ anaerobe care consumă O_2 dizolvat în apele din adânc, diminuă cantitatea de substanță organică şi deschid calea acțiunii microorganismelor anaerobe.

Faza a doua - fizico-chimică este de lungă durată. Cea mai mare parte a materiei organice trece în această fază. In cursul ei, lipidele, prin modificări structurale minore formează molecule din categoria "fosilelor geochimice", iar aminoacizii şi glucidele simple, prin policondensare, formează acizii humici şi fulvici, asemănători celor descrişi în sol. Ei formează humusul marin, produs complex, coloidal, asemănător celui din sol. Continuarea procesului de policondensare şi a celui de sedimentare realizează transformarea sedimentului organic în *kerogen,* care reprezintă sursa principală de formare a petrolului, a gazelor şi a şisturilor bituminoase.

Procesul de sedimentare continuă zeci, chiar sute de milioane de ani, în condiții în care temperatura creşte cu circa 30°C/km. Kerogenul, format din nuclei poliaromatici, legați prin lanțuri alifatice suferă un proces de degradare termică menajată, care are drept consecință dispariția grupărilor funcționale (acid, ester, cetonă, etc.) şi menținerea nucleilor poliaromatici. Se produc rearanjări moleculare, eliminarea CO_2, H_2O şi a produşilor oxigenați, degradarea lanțurilor alifatice, determinând formarea țițeiului.

Țițeiul conține cantități variabile de sulf, între 0,025 şi 6%, sub formă legată în peste 200 de molecule organice complexe sau ca S elementar, sulfați, sulfuri, tiosulfat.

Se admite că sulful din petrol este rezultatul activității bacteriilor sulfat-reducătoare, active în faza de sedimentogeneză asupra compuşilor cu sulf din mediu pe care îi introduce în combinații organice complexe. Microorganismele realizează şi interacțiile inverse, de desulfurizare *in situ*, prin degradarea compuşilor sulfului cu eliberare de H_2S.

Rolul microorganismelor eliberarea, migrarea şi acumularea țițeiului zăcământ

După formare, țițeiul este regăsit în stare dispersată şi conservat ca atare în roca-mamă. Pentru a forma zăcăminte, el trebuie să migreze şi să se acumuleze în rezervorul poros *(migrarea primară).* Apoi se deplasează în interiorul rezervorului pentru a se acumula la nivelul unei capcane anticlinale sau a unor crăpături în strat *(migrare secundară).*

Bacteriile au un rol esențial în procesul complex de eliberare, migrare şi acumulare a țițeiului, realizabil pe mai multe căi:

1) degradarea matricei organice a resturilor vegetale, cu eliberarea picăturilor de țiței, care se reunesc prin coalescență;

2) dizolvarea carbonaților din rocile pe care este adsorbit şi formarea de canalicule şi spații goale;

3) producerea de CO_2, CH_4, H_2 şi alte gaze, care reduc vâscozitatea, în special când se află sub presiune, favorizând scurgerea până la capcane;

4) producerea de acizi graşi şi substanțe tensioactive, care acționează asupra țițeiului adsorbit sau aflat în emulsia apoasă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Solul ca mediu natural pentru microorganisme

Solul poate fi definit ca un complex de substanţe - surse de nutrienţi şi de energie - al unor organisme, descris ca un sistem dinamic cu trei faze: solidă, lichidă şi gazoasă.

Solul este rezultatul dezagregării rocilor parentale sub acţiunea factorilor fizici şi chimici şi a unor activităţi biologice care determină evoluţia substratului spre stadiul de sol.

Faza *solidă* reprezintă circa jumătate din volumul solului şi este alcătuită din substanţe *minerale* şi *organice*. Fracţiunea *minerală* are o compoziţie variabilă în funcţie de natura rocilor parentale, care pot fi:

- *roci vulcanice* (rezultate din solidificarea lavei): granitul, bazaltul
- *roci sedimentare* rezultate din depunerea şi consolidarea produselor rezultate din degradarea altor roci (gresia, marna, dolomite, şisturi argiloase, calcare)
- *roci metamorfice* (şisturi cristaline, cuarţite, gnaisul, marmora) provenite din modificarea rocilor vulcanice sau sedimentare sub influenţa temperaturii şi/sau a presiunii ridicate.

Rocile sunt infertile, dar pot adăposti cianobacterii, alge, unele eubacterii, care iniţiază procesele de degradare a rocilor.

Fracţiunea *organică* este alcătuită din resturi organice neanimate provenite din litieră, lemn, rădăcini, diferite organisme şi microorganisme, ce corespund fracţiei nealterate, dar şi din fragmente şi particule aflate în diferite grade de descompunere, incluzând şi constituienţii esenţiali ai solului, reprezentaţi de materialele *humice*.

Diferitele substanţe cu rol de nutrienţi se găsesc fie sub formă solubilă, fie adsorbite pe diferite substraturi, fie în stare insolubilă. Deşi solul conţine cantităţi suficiente sau chiar în exces de nutrienţi, aceştia sunt frecvent în forme inaccesibile plantelor şi transformarea lor în forme accesibile este una din acţiunile majore ale microorganismelor din sol.

Faza *lichidă* este reprezentată de apa din porii solului şi de pe suprafaţa particulelor de sol. Ea conţine în stare dizolvată sau de dispersie coloidală, diferite substanţe minerale şi organice şi este cunoscută sub denumirea de *soluţia solului*. Reprezintă între 0,1 şi 1% din greutatea solului.

Faza *gazoasă* corespunde aerului prezent în porii liberi din apă şi are o compoziţie modificată faţă de aerul atmosferic, având o cantitate mai mică de O_2 şi una mai mare de CO_2.

Componenta majoră a solului o formează *substanţele minerale*. Dintre acestea, siliciul sub formă de SiO_2 reprezintă 75,42% din masa totală a solului. La acesta se adaugă: Al_2O_3 (9,68%), Fe_2O_3 (3,44%), K_2O (1,78%), Na_2O (0,96%), TiO_2 (0,72%), MnO (o,11%) din compoziţia mineralelor argiloase, precum şi CaO (1,33%), MgO (0,85%), P_2O_5 (0,11%), SO_3 (0,1%) şi N (0,11%). Cantitatea de C echivalent cu materia organică este de 5,29%.

Fracţiunea cea mai impotantă pentru activitatea microorganismelor din sol este cea a mineralelor argiloase, dispuse discontinuu pe suprafaţa particulelor de nisip. În lipsa substanţelor organice, bacteriile nu pot adera, deoarece nu pot sintetiza suficiente substanţe organice proprii cu rol de aderenţă.

Argilele au compoziţii diferite în funcţie de condiţiile în care a evoluat procesul de pedogeneză. Din punct de vedere chimic, sunt alcătuite din aluminosilicaţi secundari (rezultaţi prin alterarea şi hidratarea în diferite grade a silicaţilor primari), asociaţi cu oxizi hidrataţi de Fe, Al, Mn sau cu alţi produşi finali de alterare.

Importanţa excepţională a argilelor derivă din particularitatea generală a microorganismelor de a se localiza şi de a fi active pe suprafaţa particulelor din sol, în sistemul porilor, în apropierea imediată a particulelor.

Datorită dimensiunilor mici, argilele au un raport mare suprafaţă/volum, favorizând fenomenele de adsorbţie şi interacţiune.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mineralele argiloase, ca şi materialele humice au o mare afinitate pentru moleculele de apă. De aceea, nutrienţii organici şi anorganici şi microorganismele au tendinţa să se concentreze la interfeţele argilă/apă sau substanţe humice/apă.

Argilele au funcţia de reţinere fizico-chimică şi de cedare prin schimb a unor cationi, ca de exemplu, înlocuirea Si^{4+} şi Al^{3+} cu ioni cu o valenţă mai mică.

Formarea solului

Formarea solului (solificare) este un proces complex şi foarte îndelungat, în cursul căruia, prin intervenţia unor mecanisme fizice, chimice şi biologice, roca parentală, sterilă şi inertă dobândeşte caracterul de fertilitate, fiind convertită la stadiul de sol.

Principalele etape ale acestui proces sunt:

1) *Dezagregarea* - un proces fizic de fragmentare a rocilor compacte sub acţiunea factorilor de mediu.

2) *Alterarea* - dezagregarea chimică sau biochimică, în cazul colonizării cu microorganisme - pionier (cianobacterii şi alge) sau cu licheni. În această fază se formează complexul mineral al solului.

3) *Instalarea şi dezvoltarea biocenozelor proprii* este o etapă esenţială deoarece asigură fertilitatea, adică aprovizionarea plantelor cu nutrienţi.

4) *Formarea şi acumularea humusului* - asigură prin acţiunea mezofaunei şi a microorganismelor, depozitul organic specific solului, component esenţial al fertilităţii acestuia.

Textura solului este una din proprietăţile care influenţează natura şi biologia microorganismelor şi este definită ca rezultat al proporţiilor relative ale diferitelor particule din sol (nisip, praf, argilă, etc.). Solurile dominate de o anumită clasă de particule poartă numele clasei: sol nisipos, argilos, sau sol prăfos. Cele care nu au ca dominantă o anumită clasă de particule sunt denumite *luturi*.

Structura solului se formează în procesul de pedogeneză, ca rezultat al modificărilor fizico-chimice, de formare a argilelor şi a altor coloizi, a humusului şi a activităţii organismelor vii. Structura solului este definită de aranjamentul particulelor de sol şi al porilor dintre ele. Structurile ce pot fi observate cu lupa (x4) se numesc *macrostructuri*, iar cele mai mici, *microstructuri*.

În solul structurat, particulele elementare sunt legate între ele, în unităţi structurale mai mari denumite *agregate*. Particulele de sol dintr-un agregat sunt legate prin forţe mai puternice decât forţele dintre agregatele adiacente.

Structura solului, adică modul de grupare a particulelor componente este un bun indicator pentru activitatea biologică, deoarece agregatele de sol delimitează cele mai importante microhabitate pentru microorganismele din sol. Ca fază solidă a solului, agregatele controlează cantitatea şi distribuţia apei şi a aerului.

Un sol este considerat ca având o structură bună, dacă menţine suficientă umiditate pentru a împiedica deficitul în jurul rădăcinilor în perioadele de uscăciune, dar care permite drenajul suficient pentru a evita băltirea în perioadele umede. El trebuie să aibă pori plini cu gaze, pentru a permite schimbul cu atmosfera, reducând riscul formării zonelor anaerobe.

Structura optimă a solului este cea *glomerulară* ("măzărată"), rezultată din asocierea particulelor de sol agregate sferoidale, cu diametrul de 0,2-5 mm, cu suprafaţă neregulată, cu convexităţi şi cu concavităţi. Rezultă o structură friabilă, afânată, datorită căreia agregatele mari pot fi uşor disociate la agregate de particule mai mici.

Structura solului este rezultatul a două procese complementare: agregarea particulelor şi fragmentarea masei solului.

Gruparea particulelor agregate necesită prezenţa unor substanţe cimentante, cele mai importante fiind particulele de *argile coloidale*, din solul argilos saturat în Ca^{2+} şi Mg^{2+}. *Microorganismele* au un rol complex în formarea structurii solului, condiţionat în esenţă, de capacitatea lor de a produce polizaharide sau alte materiale aderente. Cele mai active în stabilizarea structurii solului sunt cele cu g.m. 100 kD.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Humusul considerat de Chiriţă (1974) ca principalul formator de structură, datorită rolului său de aglutinare şi cimentare a particulelor influenţează formarea de agregate prin intermediul polizaharidelor, proteinelor, poliuronidelor aminate şi al substanţelor similare ligninelor pe care le conţine.

Substanţele organice derivate din exudatele radiculare, din ţesuturile vegetale muribunde, ca şi produşii rezultaţi din degradarea lor favorizează agregarea şi este sursa majoră de substanţe stabilizatoare.

Rădăcinile plantelor şi regiunile periradiculare au un rol complex în structurarea solului nisipos nestructurat. După dezvoltarea plantelor, o bună parte din particulele de sol rămân asociate cu rădăcinile.

Fauna din sol (în special râmele) ingeră cantităţi mari de materiale vegetale şi sol, care sunt mărunţite şi atacate de enzimele proprii şi bacteriene din intestin. Ulterior, depun cantităţi imense de sol şi dejecţii sub forma unor agregate coprogene cu structură glomerulară.

Sistemul poros al solului reprezintă acea parte a spaţiului pedologic în care se desfăşoară procesele de schimb între fazele lichidă, gazoasă şi solidă ale solului sau, altfel spus, între conţinutul porilor şi peretele lor. Porii reprezintă habitatul microorganismelor şi asigură reglarea hidrică şi gazoasă a acestuia. Ei reprezintă 31-45% din volumul solului. Porii diferă prin formă, lungime, sinuozitate, continuitate, diametru. Porii *fini* (diametru mai mic decât 0,2 μm) reţin apa într-o formă puternic fixată, inaccesibilă plantelor. Porii *mijlocii* (0,2-10 μm) reţin apa şi o înmagazinează, disponibilă organismelor vii. Porii *mari* (cu diamterul mai mare de 50 μm) au rol esenţial în aeroreglare. Reprezintă principalul biotop pentru organismele din sol. Apa trece cu uşurinţă prin ei.

Materia organică din sol

Materia organică, absolut necesară pentru existenţa microorganismelor heterotrofe, provine în cea mai mare parte din afara acestuia şi este formată din diferite tipuri moleculare în care predomină C, O, H, N şi cantităţi mici de alte elemente.

Materia organică din sol conţine trei fracţii majore:

- fracţiunea relativ uşor accesibilă microorganismelor, provenită în principal din descompunerea resturilor vegetale, care se reînoiesc anual;
- produşii rezultaţi din degradare la forme relativ stabile, prin metabolismul organismelor din sol, având o vechime de circa 25 de ani;
- materia organică foarte rezistentă la degradare, în special de natură humică: substanţe complexe rezultate din conversia unor produşi de degradare a ligninei sau din sinteza *de novo* de către microorganisme, din precursori aromatici şi nearomatici, cu o vechime de 250-2500 de ani.

In funcţie de proprietăţile chimice şi de relaţiile fizice cu constituienţii solului, substanţele organice aparţin următoarelor categorii:

1) *Molecule organice mici şi difuzibile* solubile în faza apoasă a solului: monoglucide, aminoacizi, acizi organici, monomeri aromatici. Ele provin din degradarea resturilor organice adăugate recent în sol (litieră, exudate radiculare, etc). Se adaugă substanţele solubile provenite din resturi şi excremente animale, deosebit de importante prin aportul de compuşi cu azot, fosfor şi sulf.

2) *Substraturile macromoleculare* includ o varietate de structuri polimerice, a căror utilizare necesită o degradare prealabilă sub acţiunea unor enzime extracelulare: celuloza, hemicelulozele, lignina (cel mai important substrat vegetal, după celuloză), polimerii de natură microbiană (chitină, peptidoglicani, acizi teichoici, polizaharide - levanii, dextranii, xanthanii, alginaţii, etc), surse importante de glucoză, arabinoză, manoză, galactoză, ramnoză, xiloză, acizi uronici (acidul glucuronic şi galacturonic), glucozamină, etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O mare parte din substanţele organice sunt asociate cu fracţiunea minerală din sol, în special cu argilele. Fenomenul adsorbţiei polizaharidelor are ca rezultat scăderea sensibilităţii lor la biodegradare.

Substanţele organice pot fi asociate cu substanţele *humice* din sol, efectul fiind de creştere a rezistenţei la degradare.

Humusul

Principalul constituient specific al solului şi factor esenţial al fertilităţii acestuia, humusul este un complex de substanţe coloidale amorfe, de culoare brun-neagră, format prin descompunerea parţială a resturilor vegetale, animale şi microbiene.

Humusul este alcătuit din sisteme coloidale, interconectate tridimensional, de natură predominant aromatică, cu caracter fenolic, chinoinic sau cetonic, cu dimensiuni moleculare variate şi aparţinând heteropolicondensatelor cu mare rezistenţă la atacul microbian.

Humusul este alcătuit din două grupuri principale de constituienţi: constituienţii specifici sau substanţele humice propriu-zise şi constituienţii nespecifici (nehumici), reprezentaţi de diferite substanţe organice, în diferite grade de degradare şi eliberare din ţesuturile din care provin (lignine, celuloză, hemiceluloze, pectine, proteine), precum şi diferiţi intermediari de descompunere (monoglucide, aminoacizi, acizi organici, fenoli, etc).

Substanţele humice propriu-zise, în funcţie de gradul de solubilitate pot fi grupate în următoarele fracţiuni:

1) *Fracţiunea solubilă* în soluţii alcaline este reprezentată de *acizii humici.* Componenţii ei pot fi separaţi *acizi fulvici* hidrosolubili şi neprecipitabili cu acizi (HCl, H_2SO_4) din soluţia alcalină şi *acizi huminici,* precipitabili cu acizi din soluţia alcalină.

Acizii fulvici, heterogeni din punct de vedere chimic reprezintă stadiul iniţial de transformare a produşilor intermediari rezultaţi din descompunerea masei reziduale organice (g.m. 2000-8000 D).

Acizii huminici sunt constituienţi majori ai humusului din solurile fertile. Solubili în soluţii alcaline, insolubili apă, au un grad mare de polimerizare (g.m. 50 000-100 000 D). Se pot forma prin polimerizarea acizilor fulvici.

2) *Fracţiunea insolubilă* este reprezentată de *humine*. Ele sunt complexe macromoleculare de acizi fulvici şi huminici, strâns legate de materiale minerale. Insolubile în alcali, huminele formează fracţiunea cea mai stabilă a solului. Huminele marchează stadiul final al biosintezelor humice. Pot avea vechime între 2000 şi 5000 de ani. Dau culoarea caracteristică (brun-închis spre brun-negru) a straturilor superficiale ale solului.

Materialele humice au o importanţă esenţială pentru viaţa din sol. Cel mai adesea, ele se asociază intim cu argilele pentru a forma *complexe organo-minerale*.

Structura chimică a humusului nu este definită exact. Există tendinţa de a considera că materialele humice nu au o structură chimică definită, deoarece sunt polimeri asamblaţi neregulat.

Modelul structural propus de Stevenson (1976) are la bază existenţa unei porţiuni centrale ("core"), constând din cicluri aromatice, heterociclice şi chinoidale condensate, conectate şi interconectate prin legături C-C, amino şi azo. Ciclurile poartă o serie de grupări funcţionale de tip carboxil, hidroxil, fenolic şi carbonilic. De porţiunea centrală a moleculei sunt legate glucide, aminoacizi şi fenoli, care la rândul lor formează alte interconexiuni. Astfel, rezultă o structură complexă tridimensională, ca un burete, care absoarbe apa, ionii şi moleculele organice în mod reversibil. Diferiţii compuşi organici naturali sunt legaţi sau "absorbiţi" în structura sa. Datorită structurii tridimensionale, polimerii humici se pot extinde, expunând diferite zone ale suprafeţei lor, ce pot influenţa interacţiunile cu enzimele din sol, cu microorganismele şi cu diferite substraturi.

Procesul de humificare este puţin cunoscut. Pe plan global, el reprezintă o stare intermediară între procesele de reciclare imediată şi rapidă, care determină degradarea resturilor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de substanţe organice (în special vegetale), ajunse în sol şi cele de depunere de combustibili fosili. Se consideră că majoritatea humusului este de origine biogenă şi corelat cu procesul de ligninoliză. Lignina este abundentă în ţesutul lemnos matur (18-30%) şi împreună cu celuloza şi hemicelulozele formează pereţii celulelor vegetale, un substrat greu degradabil. Totuşi, în 6-8 luni, 60-75% din lignină este degradată de fungii putregaiului alb.

Paralel cu acest proces, în strânsă apropiere fizică are loc procesul de formare a humusului. Detaliile procesului nu se cunosc, pentru că nici structura ligninelor şi nici cea a humusului nu au fost elucidate. Se ştie însă că macromoleculele complexe ale humusului prezintă un grad înalt de variabilitate. Procesul de humificare evoluează extrem de lent. Substanţele humice au vechimi cuprinse între 20 şi 5000 de ani. În acest interval, ele sunt continuu reciclate (mineralizate) şi resintetizate.

Humificarea, ca proces secundar ligninolizei, evoluează în etape succesive, în cursul cărora procesele de descompunere sunt însoţite de reacţii de sinteză şi polimerizare a unor molecule de bază.

Structura de bază a humusului, reprezentată de ciclurile aromatice, poate avea originea în produşii de degradare a ligninei sau poate fi sintetizată *de novo* de unele microorganisme, din alte substraturi. Nu este exclusă înglobarea unor resturi aromatice ale unor molecule artificiale, cum sunt unele pesticide.

Procesul de humificare este extrem de lent, dar are un caracter permanent. Componentele humusului se reînoiesc treptat, cu o rată dependentă de complexitatea şi stabilitatea lor. De aceea, compoziţia sa nu este stabilă. Din acest punct de vedere, humusul se comportă asemenea unui organism viu.

În absenţa activităţii biologice, în condiţiile unui pH acid, temperatură scăzută, umiditate mare, conţinut crescut de materie organică săracă în compuşi azotaţi, are loc humificarea abiologică, foarte lentă, având ca rezultat producerea de *turbă* (aglomerare masivă de materie organică, saturată cu apă, puţin degradată, în condiţii de anaerobioză).

Humusul reprezintă una din cele mai răspândite şi mai abundente materii organice din sol, substratul dezvoltării microorganismelor şi al fertilităţii solului, pentru că asigură nutrienţii în forme accesibile. Fertilitatea este consecinţa degradării permanente a humusului de către microorganisme. Materialele humice sunt într-o stare de echilibru dinamic: descompunerea lor treptată este compensată prin resinteză.

Factorii de mediu care influenţează natura, numărul şi activitatea microorganismelor

Apa şi umiditatea asigurată de ea sunt esenţiale pentru creşterea, activitatea, supravieţuirea şi germinarea sporilor diferitelor categorii de microorganisme. Umiditatea solului este expusă la mari fluctuaţii sezoniere şi chiar diurne. Apa gravitaţională se scurge sau se infiltrează datorită gravitaţiei. O parte este reţinută contra gravitaţiei şi poate fi utilizată de sistemele biologice.

Apa din sol acţionează ca solvent pentru nutrienţii minerali, care vor fi preluaţi de plante şi de microorganisme. Solurile foarte uscate cât şi cele foarte umede limitează dezvoltarea microorganismelor. Bacteriile devin inactive când solul argilos conţine mai puţin de 12% apă. Umiditatea în exces stimulează procesul negativ de denitrificare. Fungii sunt mai rezistenţi la uscăciune. Necesarul lor de umiditate este foarte diferit. Aşa se explică de ce unele boli fungice sunt limitate la anumite regiuni.

Prezenţa apei în sol influenţează deplasarea microorganismelor între pori, de-a lungul rădăcinilor şi în jurul resturilor vegetale.

Aerarea reprezintă procesul prin care gazele produse sau consumate sub suprafaţa terestră sunt schimbate cu cele din aerul atmosferic. Porii din sol care nu sunt ocupaţi de apă conţin gaze ce formează atmosfera solului. Atmosfera solului conţine o concentraţie mai mică de O_2, iar a CO_2 este de 10-100 de ori mai mare decât a aerului atmosferic. Distribuţia celor două

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

gaze în sol, influenţată de fenomenele de difuzie şi de respiraţie a microorganismelor este inegală, astfel încât unele zone pot fi aerobe, iar altele anoxice. Sub acest raport, solul nu este uniform, ci este o colecţie de microhabitate în care condiţiile de aerobioză şi anaerobioză coexistă în teritorii foarte apropiate.

Lipsa O_2 sau prezenţa peste o anumită concentraţie a CO_2 inhibă creşterea rădăcinilor, al căror apex este foarte sensibil la lipsa O_2.

Temperatura este un factor variabil în straturile de la suprafaţa solului, putând să crească datorită razelor calorice solare până la 55° în regiunile temperate, 70° la tropice şi 88° în Valea Morţii din California. Prezintă variaţii diurne, ca şi variaţii sezoniere. Variaţiile sunt mai mari în solurile lipsite de vegetaţie.

Solurile au, în general, *valori pH* cuprinse între 4,8 şi 8,5. Ele posedă un sistem tampon complex, dependent de capacitatea de schimb ionic a argilelor şi a materiei organice coloidale, dar valorile pH sunt influenţate de activitatea metabolică a microorganismelor. Degradarea litierei poate să producă un pH acid în straturile de suprafaţă, iar reducerea nitraţilor la N_2 şi a sulfatului la sulfuri, în condiţii anoxice favorizează alcalinizarea solului.

Adâncimea influenţează densitatea microorganismelor prin efectele concentraţiei O_2 şi CO_2, a nutrienţilor, a umidităţii, etc. Frecvenţa microorganismelor în sol scade brusc cu adâncimea, în raport cu numărul mare prezent la suprafaţă.

Microbiota din sol

Solul este un mediu potrivit pentru dezvoltarea microorganismelor. Numărul şi diversitatea lor sunt mai mari decât mediul acvatic. Solul oferă condiţii foarte heterogene şi de aceea poartă populaţii de microorganisme cu particularităţi biologice şi biochimice foarte diferite. Micropopulaţiile din sol sunt alcătuite din bacterii (eubacterii, actinomicete, cianobacterii), microfungi, alge şi protozoare.

Winogradski (1949) a propus diferenţierea ecologică două categorii:

Microorganismele autohtone (indigene, permanente sau constante) sunt cele mai numeroase şi caracteristice unui anumit tip de sol. Ele sunt adaptate la viaţa în solul "normal", adică solul care nu conţine substanţe organice în curs de fermentaţie sau putrefacţie. Microorganismele indigene cresc lent, utilizând nutrienţi prezenţi sol, inclusiv substanţe stabile cum sunt cele humice. Dezvoltarea lor nu este dependentă de surse exogene de nutrienţi şi de aceea nu sunt expuse fluctuaţiilor numerice semnificative.

Microorganismele zimogene (temporare sau de fermentaţie) au o activitate periodică, intermitentă, cu faze de activitate şi de repaus. Nu pot utiliza substanţele complexe din sol şi se dezvoltă pe substanţe organice, uşor utilizabile, provenite de la exterior: resturi vegetale, excrete şi resturi animale, etc. In mod obişnuit, sunt puţin numeroase, dar se dezvoltă luxuriant după adăugarea substanţelor organice exogene. După epuizarea substratului numărul lor scade brusc.

Cele două categorii de microorganisme nu pot fi separate în mod cert. Unii cercetători consideră că microorganismele zimogene intră în sol odată cu resturile organice pe care le degradează, în timp ce alţii le consideră ca microorganisme heterotrofe autohtone cu anumite particularităţi fiziologice şi biochimice, prezente permanent în stare latentă sol. Ei limitează termenul de *alohton* la patogenii pentru plante, animale şi om care ajung în sol, cu ţesuturile vegetale infectate sau bolnave, apele reziduale, cu dejecţiile şi cadavrele animalelor bolnave. Ele formează *microbiota de tranziţie*, deoarece, în general, nu găsesc condiţii de multiplicare ci numai de supravieţuire temporară. Puţine specii patogene (de exemplu, *Cl. tetani*) pot persista îndelung în sol.

Determinările numerice ale diferitelor categorii de microorganisme au evidenţiat dependenţa lor de natura, de orizontul şi de adâncimea de la care au fost recoltate, de particularităţile de umiditate, de pH, de conţinutul în substanţe organice şi de gradul de oxigenare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Bacteriile se dezvoltă într-un număr imens de habitate, cu dimensiuni milimetrice sau mai ales micrometrice, iar în restul solului doar supraviețuiesc. Ele formează microcolonii (uneori cu mai puțin de 10 celule) pe suprafața particulelor de sol. Creșterea este mult mai importantă pe particulele de humus, pe diferite substraturi organice, decât pe cele de nisip.

Unele minerale argiloase stimulează rata de creștere a bacteriilor, dar inhibă creșterea fungilor.

Factorul care influențează decisiv creșterea microorganismelor este concentrația nutrienților. Pentru alge și bacteriile autotrofe este esențială concentrația nutrienților organici.

Abundența protozoarelor este corelată cu numărul bacteriilor, deși protozoarele saprozoice depind direct de prezența și de cantitatea de materie organică în mediu.

Viața microorganismelor din sol este influențată în mare măsură, de fenomenele de adsorbție. Microorganismele, ca și nutrienții organici sunt frecvent adsorbiți și concentrați pe anumite particule.

Bacteriile reprezintă grupul cel mai numeros și mai activ din sol. Predomină bacteriile Gram negative. Cele Gram pozitive sunt mai frecvente decât mediile acvatice și li se adaugă bacterii care dau reacții Gram variabile. Bacteriile prezintă un pleomorfism accentuat în comparație cu morfologia descrisă drept clasică. Valorile medii furnizate de tehnicile actuale sunt de 10^6-10^8-10^9 celule/g sol uscat, prin tehnica cultivării celulelor viabile și de 10^{10} celule, prin tehnicile de numărare directă, care însumează celulele vii și moarte.

Bacteriile sunt rareori libere faza lichidă a solului. Ele se găsesc frecvent sub formă de microcolonii de diferite resturi vegetale adsorbite pe argile și pe humus, inclavate în mase de humus extracelular. In funcție de gradul de dispersie pe mediile de cultură, o microcolonie sau un agregat de bacterii din sol poate forma pe mediile de creștere, o singură colonie sau un număr de colonii mai apropiat de numărul celulelor individuale.

În general, tehnicile de apreciere a numărului de bacterii din sol prin cultivare în laborator reflectă numai 1-10% din situația reală, deoarece nici un mediu de cultivare nu poate satisface enorma diversitate a exigențelor lor nutriționale.

Cunoscând numărul aproximativ al bacteriilor din sol se poate calcula biomasa lor, fie în funcție de volumul mediu ocupat, fie ca greutate la unitatea de suprafață (ha).

Alexander (1971) propune ca bază de calcul, un volum de 1 μm^3/celulă și o greutate umedă de $1,5x10^{-12}$ g/celulă. La o densitate de 10^8 celule/g sol uscat, bacteriile ocupă 0,01% din volumul total al solului, iar la densitatea de 10^9 bacterii, 0,1%. Raportat la greutate, la densitatea de 10^8 celule, bacteriile reprezintă 0,015%, iar în cazul a 10^9 celule, 0,15% din masa totală a solului.

În sol se găsesc toate bacteriile implicate în circulația carbonului, a azotului, a fosforului, a sulfului, a fierului și a celorlate elemente natură, cele implicate în formarea și degradarea humusului, în solubilizarea compușilor organici și anorganici, insolubili și inaccesibili plantelor. Se adaugă o serie de bacterii heterotrofe, relativ constante în toate solurile: *Acinetobacter, Achromobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Cellulomonas, Chromobacterium, Clostridium, Corynebacterium, Flavobacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Pseudomonas, Sarcina, Staphylococcus, Streptococcus, Xanthomonas, etc.*

Rolul bacteriilor din sol este imens. Ele participă la procesele de mineralizare, esențiale pentru nutriția plantelor și asigurarea fertilității solului. Sunt organisme capabile să îmbogățească solul în azot combinat, prin fixarea N_2. Prin polizaharidele extracelulare, participă la agregarea particulelor de sol și la formarea humusului.

Actinomicetele sunt la fel de numeroase ca și bacteriile propriu-zise (10^5-10^8 /g sol), deși determinările nu reflectă densitatea lor reală și nici activitatea lor sol. Coloniile *in vitro* pot să aibă originea, deopotrivă, în spori, fragmente de hife sau hife întregi. Sunt prezente sol, în special, sub formă de spori. Sunt mai numeroase în straturile de la suprafața solului. Nu se dezvoltă sub pH 5,0. Preferă solurile bogate în substanțe organice. După adăugarea acestora în sol, inițial se dezvoltă bacteriile și fungii. Actinomicetele se dezvoltă mai lent, când nutrienții tind să devină limitanți pentru

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

bacterii şi fungi. Ele se dezvoltă heterotrof, utilizând surse de C simple sau complexe (glucide, acizi organici, polizaharide, hidrocarburi alifatice). Degradează molecule rezistente: celuloza *(Nocardia cellulans, Streptomyces violaceus, S. cellulosae)*, chitina, parafinele, fenolii, etc. Sursa de azot este NH_3 şi nitritul, dar utilizează şi aminoacizii şi peptonele.

Speciile cele mai frecvente aparţin genurilor: *Actinomyces, Actinoplanes, Mycobacterium, Mycococcus, Micromonospora, Nocardia, Streptomyces* şi *Thermoactinomyces.*

Actinomicetele au *rol în mineralizarea* compuşilor rezistenţi (chitina) la acţiunea bacteriilor şi fungilor, contribuie la *formarea humusului* prin producerea de compuşi aromatici şi la formarea structurii solului, *fixează* N_2 (g. *Frankia*) şi formează *simbioze* de tipul actinorizelor, produc o gamă largă de *substanţe antibiotice* (streptomicină, tetracicline, cloramfenicol, kanamicină, micostatină), unele sunt fitopatogene (*S. scabiei* produce râia comună a cartofului), iar cele termofile pot fi dominante în substraturile vegetale încinse, în platformele de gunoi, unde temperatura ajunge la 80-90°.

Cianobacteriile se dezvoltă stratul superior, iluminat al solului. Genurile cele mai frecvent întâlnite: *Anabaena, Aulosira, Calothrix, Chrococcus, Cylindrospermum, Lyngbya, Microcoleus, Nodularia, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Plectonema, Scytonema, Tolypothrix.*

Se pot dezvolta şi la întuneric, chemorganotrof, făcând transformarea unor compuşi organici simpli, esenţiali pentru menţinerea fertilităţii solului.

Fungii reprezintă o parte importantă din biomasa microbiană din anumite tipuri de sol. Deşi mai puţin numeroşi în comparaţie cu bacteriile, datorită creşterii hifale, depăşesc adesea greutatea globală a acestora.

Tehnicile pentru evaluarea cantitativă a fungilor în sol, oferă rezultate denaturate de o serie de condiţii specifice. Rezultatele oferite de tehnicile de examinare directă sunt falsificate de faptul că hifele moarte persistă în sol peste 6 luni şi numărul lor este foarte mare. În plus, cele vii pot fi metabolic active şi cresc pe medii artificiale, metabolic active care nu cresc, metabolic inactive, dar capabile de creştere cultură şi metabolic inactive care cresc numai după ce sunt expuse unor artificii de tehnică.

Cultivarea pe medii selective (pentru inhibiţia creşterii bacteriilor) favorizează speciile care cresc repede, pe cele ce sporulează abundent şi pe cele care pot folosi eficient nutrienţii din mediul de creştere. Agitarea probei influenţează numărul de colonii, pentru că determină dezintegrarea hifelor într-un număr imens de fragmente şi eliberarea sporilor din sporofori. Majoritatea coloniilor sunt generate de spori, astfel că datele obţinute pe această cale reflectă activitatea fungilor într-o perioadă anterioară examenului de laborator. Se apreciază că numărul unităţilor fungice/g de sol variază între 20 000-1 000 000 (unitatea fungică este structura generatoare a unei colonii: un spor, o hifă, un fragment de hifă).

După Burges (1966), fungii din sol aparţin la peste 600 de specii, între care 200 *Phycomycetes*, 32 *Ascomycetes* şi 385 *Fungi Imperfecti*.

Clasa *Phycomycetes* este reprezentată de fungi din ordinul *Mucorales*, cu genurile *Absidia, Cunninghamella, Mortierella, Mucor, Rhizopus* şi *Zyorhynchus*, etc şi ordinul *Peronosporales*, cu g. *Pythium.*

Clasa *Ascomycetes* este reprezentată de g. *Chaetomium* şi *Morchella.*

Clasa *Fungi Imperfecti*, cea mai numeroasă este reprezentată de genurile: *Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Cephalosporium, Cladosporium, Curvularia, Fusarium, Geothricum, Myrothecium, Penicillium, Phoma, Trichoderma, Turbecularia, Verticillium*, etc.

Fungii din sol sunt organisme indigene sau alohtone, care trăiesc liber sau în asociaţie cu rădăcinile plantelor. Sunt răspândiţi la suprafaţa solului, unde descompun materia organică. În condiţii favorabile se dezvoltă masiv şi degradează o gamă largă de substanţe organice, de la cele simple, la cele complexe (proteine, celuloză, lignină). In absenţa nutrienţilor trec în stare de latenţă. Participă la formarea structurii solului şi au rol în formarea humusului, deoarece multe specii produc substanţe aromatice asemănătoare ligninelor. Unii fungi sunt prădători, participând la menţinerea echilibrului biologic în sol, iar alţii produc substanţe antibiotice sau formează asociaţii micorizice cu rădăcinile plantelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Algele sunt abundente habitatele umede şi iluminate de la suprafaţa solului şi stratul superior de câţiva mm, până la câţiva cm. Ele aparţin încrengăturilor *Chlorophyta, Diatomeae* şi *Xanthophyta.*

Algele verzi *(Chlorella)* sunt mai frecvente în solurile acide: *Chlamydomonas, Chlorella, Cladophora, Pleurococcus, Protococcus, Scenedesmus, Ulothrix, Chlorococcus* etc. Unele specii *(Chlorococcus humicola)* sunt specifice pentru sol.

Activitatea microalgelor este puţin semnificativă pentru transformările biochimice din sol. Dezvoltarea intensă a algelor pe suprafaţa solului umed îl îmbogăţeşte în compuşi organici (biomasă algală) rezultaţi prin fotosinteză. Algele verzi sunt, alături de cianobacterii, primii colonizatori ai solurilor denudate, necultivate sau lipsite de forme de viaţă (ca, de exemplu, după erupţiile vulcanice).

Protozoarele din microbiota permanentă sunt prezente mai ales la suprafaţa solului umed şi în stratul superficial (15 cm). Numărul lor variază tre 10 000-300 000/g, dar ca biomasă sunt mai importante decât bacteriile. Acest număr prezintă fluctuaţii mari de la o zi la alta, corelate invers cu mărimea populaţiilor bacteriene. De asemenea, pot prezenta fluctuaţii numerice diurne, în funcţie de temperatură, de umiditate, disponibilitatea nutrienţilor, etc.

Condiţiile de mediu favorabile dezvoltării protozoarelor sunt relativ puţin cunoscute. Umiditatea este esenţială pentru existenţa formelor active, pentru mobilitatea şi dispersia în sol, iar uscăciunea favorizează închistarea. Chiştii protozoarelor au o rezistenţă mare la condiţiile de mediu (temperatură, uscăciune, pH).

Unele protozoare sunt saprozoice (utilizează compuşi organici solubili). Foarte multe sunt holozoice (nutriţie de tip animal, ingerând materie organică complexă) şi ingeră bacterii, alge sau chiar protozoare.

Nutriţia protozoarelor cu bacterii are un pronunţat caracter de selectivitate, în sensul că unele bacterii sunt "prădate" uşor, altele rar, iar altele chiar deloc. Fenomenul ţine, probabil, de particularităţile protozoarelor de a recunoaşte anumite specii bacteriene.

Cele mai răspândite protozoare din sol aparţin la trei grupuri majore: *Rhizopoda (Sarcodina), Flagellata (Mastigophora)* şi *Ciliata.*

Clasa *Sarcodina: Acanthamoeba, Amoeba, Biomyxa, Euglypha, Nuclearia, Naegleria* şi *Leptomyxa,* etc.

Clasa *Flagellata* include subgrupa *Phytomastigophora* (flagelate care conţin clorofilă şi cresc fotosintetic) şi subgrupa *Zoomastigophora* (flagelate heterotrofe): *Bodo, Cercomonas, Tetramitus,* etc.

Clasa *Ciliata* este reprezentată de genurile *Balantidium, Colpidium, Oxytricha, Urotricha, Vorticella,* etc.

Protozoarele au rol în păstrarea echilibrului biologic al solului, corelat cu capacitatea multora de a ingera şi distruge o serie de bacterii. Un singur protozoar *(Sarcodina)* poate ingera zilnic 30-40 000 bacterii.

Interacţiuni între rădăcinile plantelor şi microorganismele din sol. Rizosfera

Rădăcinile plantelor reprezintă microhabitate pentru microorganismele din sol. Raider (1947) a descris colonizarea rădăcinilor unor angiosperme de către hifele fungice.

Rizosfera este definită cu ambiguitate. Ea este regiunea din sol care conţine rădăcinile unei plante şi microorganismele care le înoţesc.

"Spălarea" cu diferite grade de agitare a rădăcinilor unei plante, evidenţiază diferenţe importante între regiunile rizosferei. De aceea, rizosfera a fost definită ca stratul de sol ce aderă de sistemul radicular după agitarea uşoară, care îndepărtează solul legat lax, iar în termenul de *rizoplan* defineşte ceea ce rămâne legat ferm de rădăcini după o agitare puternică în apa sterilă pentru a îndepărta solul strâns aderent.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Din punct de vedere fiziologic, rizosfera ar fi regiunea din sol periradicular în care se resimt efectele substanţelor exudate de plantă, care realizează aşa numitul "efect de rizosferă". Această zonă se poate extinde cu 2 cm de la suprafaţa rădăcinii în teritoriul bogat nutrienţi (aminoacizi, glucide, vitamine) pentru care competiţionează microorganismele permanente din sol.

Situaţia este mai complexă pentru că limitele rizosferei depind nu numai de cantitatea de substanţe exudate din rădăcini, ci şi de proprietăţile fizice şi chimice ale solului, care afectează difuzia lor, ca şi numărul şi natura microorganismelor. Dacă microorganismele din rizoplan sunt abundente, ele pot consuma substanţele exudate şi efectul de rizosferă are o extindere limitată. Invers, într-un sol nisipos, cu puţine microorganisme, rizosfera poate avea mai mulţi centimetri. În solul bogat în substanţe organice, spre deosebire de solul sărac, efectul de rizosferă nu se resimte.

In concluzie, rizosfera nu este un teritoriu uniform, bine definit, ci o regiune periradiculară care conţine un gradient de microorganisme şi de activităţi mai importante în solul adiacent sistemului radicular, diminuând progresiv pe măsură ce distanţa faţă de acesta creşte.

Cu excepţia micorizelor la care hifele fungice acoperă complet rădăcinile scurte laterale, relaţia dintre microorganisme şi rădăcini este diferită, colonizarea acestora având un caracter discontinuu. Ele sunt, cel mai adesea, grupate în mici agregate şi colonizează joncţiunile celulelor epidermice, la nivelul cărora eliberarea de exudat este maximă.

Microscopia electronică a interfeţei sol/rădăcină a evidenţiat că bacteriile care se dezvoltă pe rizoplan, izolate sau ca microcolonii, sunt inclavate într-un mucigel cu grosimea de 1-10 μm. Mucigelul, de natură polizaharidică, cu componenţi fenolici şi structură granulară sau fibrilară este repartizat inegal, fiind depus în straturi mai groase la joncţiunea celulelor epidermice şi în zona de creştere a rădăcinilor.

Frecvent, bacteriile de pe rădăcinile plantelor sunt asociate cu hifele fungilor.

Dinamica creşterii bacteriilor pe suprafaţa rădăcinilor este diferită de cea observată în laborator şi depinde de disponibilitatea nutrienţilor exudatului radicular.

Zonele periradiculare sunt populate de comunităţi extrem de numeroase şi de active de microorganisme. Efectul stimulator este maxim pe rizoplan, unde se găsesc şi cele mai numeroase populaţii de microorganisme şi scade treptat spre numărul caracteristic solului normal, pe măsură ce distanţa faţă de rădăcină creşte. Fenomenul este determinat de faptul că rădăcinile eliberează un exudat, cu o compoziţie complexă, cu efect stimulator, descris sub denumirea de *efect de rizosferă*.

Cele mai frecvente substanţe ale exudatului sunt *glucidele* (glucoză, fructoză, xiloză, maltoză, ramnoză, rafinoză, arabinoză, zaharoză), *aminoacizi* (alanină, acizi aspartic şi glutamic, glicocol, leucină, valină, serină, iar la unele plante şi/sau prolină, fenilalanină, cisteină, metionină, lizină, triptofan, treonină), *acizi organici* (acid acetic, propionic, butiric, oxalic, citric, tartric, fumaric, glicolic, malic, succinic, etc), *vitamine* (biotină, tiamină, niacină, acid pantotenic, piridoxină, mezoinozitol), *factori de creştere* (auxine, etc).

Prezenţa microorganismelor stimulează producerea de exudate. Plantele de grâu şi orz, cultivate în solul nisipos steril, eliberează prin exudate 8% din carbonul total, iar în condiţii septice eliberează 15%. În solul normal fertil, care conţine o mai mare diversitate de microroganisme, cantitatea de C eliberat în exudate, este de 5-20 ori mai mare decât în culturile hidroponice aseptice.

Rizosfera stimulează multiplicarea bacteriilor şi a fungilor. Bacteriile din rizosferă sunt reprezentate de o mare proporţie de bacili Gram negativi şi un număr mai mic de coci, bacili şi bacterii pleomorfe Gram pozitive. Numărul bacteriilor prezente rizosferă este estimat la $5x10^6$-$1x10^9$ celule/g, iar al celor din rizoplan, la mai multe miliarde/g.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Efectele microorganismelor asupra plantelor

Numeroase observaţii pledează pentru o serie de efecte benefice, fără a exclude, în anumite cazuri, posibilitatea unor consecinţe negative. Plantele dezvoltate în solul obişnuit, nesteril sunt mai viguroase decât plantele -martor cultivate în soluri sterile.

Microroganismele facilitează sau participă la absorbţia nutrienţilor din sol, în special când aceştia sunt limitanţi pentru creştere. Ele desfăşoară permanent o acţiune de reciclare şi solubilizare a nutrienţilor minerali, intensificată de "efectul de rizosferă". Microorganismele din rizosferă au o influenţă benefică asupra nutriţiei cu fosfor. Katznelson (1965) a evidenţiat în rizosfera unor plante, microorganisme care solubilizează fosforul din fosfaţii organici şi anorganici insolubili. Bacteriile din rizosferă măresc solubilitatea compuşilor cu Fe, prin producerea de chelatori organici, precum şi rata preluării Ca, a cărui solubilitate este mărită prin producerea de CO_2 în rizosferă.

Interacţiunile nutriţionale cele mai cunoscute sunt cele din asociaţiile simbiotice, de tipul celor fixatoare de N_2 sau al micorizelor.

Fungii din micorize exercită un efect benefic complex prin :

- stimularea creşterii şi ramificării rădăcinilor;
- dezvoltarea hifelor explorează un volum mai mare de sol;
- hifele înglobează eficient concentraţiile mici de nutrienţi;
- rădăcinile cu micorize sunt mai rezistente la infecţii;
- micorizele ectotrofe au propria lor rizosferă.

Sistemul radicular al plantelor crescute în sol nesteril este mai bogat decât al plantelor cu rădăcini sterile, are mai multe rădăcini laterale şi mai mulţi peri radiculari. Plantele cresc mai repede, sunt mai verzi, înflorirea este grăbită şi fructele apar mai timpuriu.

Bacteriile *Ps. aurantiaca, Ps. fluorescens, Ps. radiobacter* şi *Bacterium herbicola* produc vitamine ca: tiamina, biotina, riboflavina şi acidul pantotenic. Numeroase bacterii din rizosferă produc acid indolil-3-acetic, în special când triptofanul este prezent în mediu.

Microorganismele din rizosferă pot exercita şi unele efecte negative asupra plantelor când competiţionează pentru nutrienţi minerali sau pentru oxigen, când interferă cu absorbţia nutrienţilor, când intensifică activitatea unor agenţi patogeni sau când produc substanţe fitotoxice.

În categoria efectelor negative se înscriu şi cazurile de potenţare a patogenităţii unor agenţi patogeni puţin virulenţi.

Rizosfera şi populaţiile de microorganisme care o colonizează în mod normal constituie o barieră pentru patogenii cu care competiţionează. Bacteriile din rizosferă, denumite generic *rizobacterii,* exercită un biocontrol riguros asupra unor agenţi patogeni redutabili, împiedicând apariţia bolii.

Mecanismele inhibiţiei microorganismelor fitopatogene sunt diferite şi include:

- inhibarea germinării sporilor şi a creşterii tubului germinativ;
- limitarea activităţii patogene în ţesutul radicular infectat;
- inducţia rezistenţei gazdei;
- suprimarea microorganismelor nocive din spaţiul rizosferei.

După Schippers (1988), mecanismul major implicat în controlul biologic al patogenilor este reprezentat de competiţia pentru Fe. Fe are un rol esenţial în metabolismul energetic al microorganismelor aerobe sau microaerofile. Dar, pe măsură ce valorile pH cresc peste 6,0, disponibilitatea Fe^{3+} pentru plante şi microorganisme este mult redusă. Microorganismele competiţionează pentru Fe^{3+} eliberând siderofori, mici proteine cu afinitate mare de legare a Fe^{3+}. Afinitatea sideroforilor pentru Fe^{3+} variază foarte mult la diferite microorganisme. Ea este de circa 10 ori mai mare în cazul sideroforilor de la *Pseudomonas,* comparativ cu cei ai fungilor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

H. BIODEGRADAREA ŞI BIODETERIORAREA MICROBIANĂ

În sensul larg, conceptul de biodegradare se referă la modificarea proprietăţii unor materiale, determinată de activitatea biologică a microorganismelor. Biodegradarea se exercită în special asupra materialelor organice, dar nu exclude pe cele anorganice. Biodegradabilitatea reprezintă capacitatea unui compus de a fi modificat structural sub acţiunea micoorganismelor.

Biodegradarea este un proces cu efecte pozitive, atât natură, cât şi în economia societăţii umane. Pe plan global, ele au o contribuţie majoră la circulaţia elementelor biologice natură, iar pe plan local împiedică acumularea materialelor reziduale, a diferiţilor contaminanţi ai mediului etc.

Biodeteriorarea reprezintă acţiunea prin care microorganismele determină transformarea unui material valoros într-unul rezidual. Este un proces cu efecte negative, care trebuie evitat sau întârziat.

Diferenţele dintre cele două procese sunt ilustrate de următoarele exemple: degradarea hârtiei care poluează un sol de pădure de către *Chaetomium globosum,* reprezintă un proces de biodegradare. Prin contrast, atacul hârtiei dintr-un depozit, determină pagube economice, reprezintă un proces de biodeteriorare. În mod asemănător, descompunerea ţiţeiului deversat în apele marine este un proces util, de combatere a poluării prin biodegradare, timp ce procesele similare ce au loc în rezervoare sau *in situ* reprezintă o biodeteriorare.

Biodegradarea compuşilor organici este capacitatea de descompunere aerobă, prin mineralizare până la CO_2, H_2O şi NH_3 sau anaerobă, cu produşi finali ca H_2S, CH_4, CO_2 şi H_2O.

Pentru compuşii anorganici, biodegradabilitatea ar corespunde degradării acestora la compuşi prezenţi în ciclul lor natural, ca de exemplu, NH_3, NO_2^-, NO_3^- şi, mai ales, N_2.

Modificări ale substratului induse de acţiunea microoganismelor

Activitatea microorganismelor expuse biodegradării şi/sau biodeteriorării determină: 1) alterări fizice; 2) modificări chimice; 3) impurificări; 4) modificări funcţionale.

1) *Modificările fizice* sunt foarte diverse, în funcţie de natura substratului atacat: caracterul friabil al hârtiei atacate, decolorarea şi modificarea consistenţei vopselelor, caracterul friabil al lemnului, gonflarea şi pierderea elsticităţii cauciucului, ruginirea şi perforarea conductelor metalice, distrugerea izolatorilor cablurilor electrice.

2) *Modificările chimice* sunt determinate prin procese de asimilare sau de dezasimilare. Modificarea prin procese de asimilare este tipică pentru celuloză. Glucoza rezultată este convertită la biomasă microbiană.

Modificările produse prin procese de dezasimilare corespund unor procese de degradare.

3) *Impurificarea şi pătarea* se datorează dezvoltării miceliului fungic care acoperă suprafeţe mari şi formează diferite substanţe colorate intens.

4) *Modificările funcţionale* sunt consecinţa fenomenelor de *fuling.* Iniţiat de microorganisme, fulingul suprafeţelor submerse ale navelor este completat prin asocierea nevertebratelor (*Teredo,* alte moluşte, polichete, etc).

Efectele negative sunt directe (degradarea lemnului, a cauciucului, a vopselelor, a unor materiale plastice, coroziunea, etc) sau indirecte (creşterea în greutate, mărirea rezistenţei la deplasare).

Biodegradarea petrolului

Numeroase microorganisme au capacitatea de a utiliza hidrocarburile gazoase, lichide şi solide din seria alifatică, aromatică, şi asfaltică drept unică sursă de carbon şi energie, descompunându-le la molecule mai simple sau chiar la CO_2 şi H_2O.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Microorganismele atacă petrolul, gazolina, kerosenul, uleiurile minerale, parafina, gazul de iluminat, gazele de sondă, cauciucul natural şi sintetic, uleiurile de răcire, suprafeţele asfaltate, conductele subterane ("pipe-line") şi cablurile electrice protejate de coroziune cu materiale impregnate, parafine, etc.

Degradarea microbiană a ţiţeiului este un proces complex, a cărui evoluţie depinde de compoziţia petrolului şi de natura comunităţilor de microorganisme caracteristice mediilor naturale.

Ţiţeiul este un amestec complex de hidrocarburi, însumând sute de compuşi individuali. Alături de hidrocarburi se găsesc fenoli, tioli, acizi naftenici, compuşi heterociclici cu azot (piridine, piroli, indol, etc), compuşi cu S (alchil-tioli, tiofen, etc).

Ţiţeiul conţine mai multe clase de hidrocarburi:

1) *Fracţiunea alifatică* (saturată) este reprezentată de alcani, compuşi saturaţi cu formula generală C_nH_{2n+2}. Hidrocarburile cu lanţ lung sunt atacate mai uşor decât cele cu catenă scurtă.

2) *Fracţiunea aromatică* este reprezentată de compuşi aromatici nesaturaţi, cel mai simplu fiind benzenul. Compuşii aromatici sunt mai greu atacaţi în procesul de biodegradare, cea mai grea etapă fiind cea de clivare a ciclului.

3) *Fracţiunea asfaltică* include componente cu structură complexă, mai puţin cunoscuţi din punct de vedere chimic.

Se apreciază că anual, 3,2 milioane tone de petrol ajung pe diferite căi în oceane, fie prin eliminări lente, fie prin deversări cu caracter brusc şi masiv, consecutive accidentelor navelor petroliere sau ale platformelor de foraj maritim.

După deversările masive, procesul de degradare evoluează în trei faze:

Faza întâia, cu o durată de la câteva ore la câteva zile, corespunde etalării rapide a ţiţeiului pe o suprafaţă mare a mediului marin, fiind asociată cu procese fizice (evaporare, dizolvare, emulsionare). In această fază, poluantul se separă în două structuri diferite:

1) Stratul superficial conţine fracţiunile cele mai uşoare, care reţine şi concentrează poluanţii chimici, detergenţi, metale grele.

2) Ţiţeiul din coloana de apă, supus unui proces de emulsionare.

Faza a doua de degradare a hidrocarburilor are loc pe două căi:

1) *Biodegradarea* este realizată în ecosistemele acvatice, în special de bacterii. Unele microorganisme planctonice (fito- sau zooplancton şi chiar unele bacterii) înmagazinează temporar hidrocarburi sub formă de picături, pe care le elimină netransformate în mediu.

2) *Degradarea chimică* (abiotică) se realizează în absenţa luminii, prin fenomene de *autooxidare* şi prin *fotooxidare,* adică prin fotoliză mediată de radicalii liberi foarte reactivi.

Faza a treia, de restabilire a echilibrului ecologic are o durată variabilă în funcţie de intensitatea poluării şi de condiţiile în care a evoluat biodegradarea.

Degradarea ţiţeiului are loc nu numai în mediul marin, ci şi în *sol.* Numeroase microorganisme din sol pot folosi ca sursă de C şi energie, toluenul, dar şi alţi compuşi (xilen, naftalen, hexan, clorbenzen, etc).

Deversarea de ţiţei brut în sol, produce o creştere numerică a populaţiilor de bacterii, cu o reducere concomitentă a diversităţii lor.

Poluarea cu doze mari omoară vegetaţia, dar todeauna, în special în condiţii de aerobioză, în intervale variabile, are loc degradarea şi revenirea la normal.

Microorganismele care degradează hidrocarburile sunt eubacterii, actinomicete, cianobacterii, levuri, fungi filamentoşi şi alge. Ele sintetizează enzime care degradează hidrocarburile individuale. Sursa de izolare este solul sau apa poluată cu resturi petroliere.

Biodeteriorarea cauciucului

Cauciucul sub diferitele sale forme (latex, cauciuc pur, comercial sau sintetic) este atacat lent de mai multe microorganisme.

Latexul pur este un produs relativ instabil, oxidabil în prezenţa oxigenului, mai ales la lumină.

Cauciucul perfect pur este un amestec de hidrocarburi cu formula $(C_5H_8)_n$.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Microorganismele degradează cauciucul natural, determinând pierderea în greutate (cu circa 22% în 2 ani), dar şi alte modificări ca gonflarea, slăbirea structurii, pierderea elasticităţii.

Cauciucul sintetic este produs prin asamblarea unor polimeri sau copolimeri de hidrocarburi nesaturate, ca butadien, metilbutadien (izopren), cloropren (clorbutadien), izobutilen, stiren.

Deşi diferă mult de cauciucul natural, ca şi cauciucul natural, cel sintetic prezintă riscul biodeteriorării, în special prin menţinere îndelungată în medii umede. În condiţii naturale, degradarea microbiană a hidrocarburilor din cauciuc este cantitativ neînsemnată în raport cu cea produsă de căldură, lumină, alcali, acizi, prin abraziune, etc. Ea devine importantă în cazul atacării învelişului izolator din cauciuc al cablurilor electrice îngropate în sol sau imersate în apă.

Biodeteriorarea vopselelor este un proces complex ce se realizează atât asupra vopselelor din recipiente, cât şi asupra celor etalate prin procedeele de vopsire. Biodeteriorarea vopselelor implică decolorarea, producerea de gaze, modificarea proprietăţilor fizice şi chimice, cu efecte negative asupra posibilităţii utilizării lor.

Biodeteriorarea vopselelor în peliculă pe lemn sau alte substraturi implică apariţia fisurilor, a desprinderii de substrat prin formare de vezicule, a caracterului friabil sau a petelor datorate, în special hifelor şi sporilor fungici.

Biodeteriorarea vopselelor are un caracter de gravitate extremă pentru operele de artă (pictură în ulei, frescă, etc).

Degradarea ţesuturilor vegetale asociată cu termogeneza microbiană

Degajarea căldurii de către microorganisme în cursul activităţii biologice, este un fenomen general. Coeficientul de folosire a energiei de către microorganisme, în cursul metabolismului, rareori depăşeşte 40-50%, iar restul se pierde în mediu sub formă de căldură.

Acest proces este deosebit de intens în cazul microorganismelor termofile, ceea ce poate produce pagube economice, datorate autoîncălzirii şi chiar aprinderii cerealelor depozitate, a clăilor de fân, a silozurilor sau a combustibililor (turbă şi cărbune).

Procesul de încălzire este iniţiat de respiraţia celulelor vegetale, după care sursa principală de căldură devin microorganismele. Iniţial, creşterea temperaturii se datorează unor microorganisme saprobionte banale, dar la 60-80° se creeează condiţii optime pentru microorganismele termotolerante şi termofile.

Autoîncălzirea la temperaturi mai mari de 80°, nu mai este determinată de activitatea microorganismelor, ci derivă din procese pur chimice de oxidare exotermă, care pot ridica temperatura ambiantă la peste 200°, producând unele gaze carburante. Dezvoltarea acestor procese în depozitele de cereale le poate transforma într-o masă carbonizată compactă.

Fenomene de "autoîncălzire" determinate de activitatea microorganismelor, se produc şi în depozitele de combustibil, în special în cazul turbei brichetate.

Procesele de termogeneză au loc în gunoiul de grajd, constituit din paie şi dejecţii, conţinând un număr imens de microorganisme diferite.

Coroziunea bacteriană a metalelor

Coroziunea metalelor este rezultatul unui proces complex, determinat de mecanisme multiple, interdependente: chimice, mecanice, electrice şi biologice. Datorită lor, Fe, oţelul, fonta şi alte metale, menţinute într-un mediu umed, suferă procese de coroziune, prin care un metal trece de la condiţia elementară la o stare de combinaţie chimică. Una din formele cele mai atenuate ale acestui proces chimic este *patina* (oxidarea naturală sau artificială), evidentă în cazul bronzului, care se acoperă cu un strat de carbonat de cupru, de culoare verzuie.

Coroziunea bacteriană este frecventă la conductele de apă potabilă şi reziduală, de gaze şi de petrol, ca şi cele ce deservesc instalaţiile sanitare. Iniţial, apar pete de rugină, adânci de 1-6 mm. Ulterior, se produc pierderi de substanţă. Coroziunea se extinde determinând perforarea conductelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Microorganismele sunt implicate în coroziunea anaerobă, prin depolarizare catodică, producerea de metaboliți corozivi, producerea de fenomene de aerare diferențială și concentrarea celulelor pe suprafața acestora etc.

Coroziunea bacteriană anaerobă are importanță majoră pentru instalațiile de forare și exploatare a sondelor. Mecanismul coroziunii nu este unanim acceptat, dar *a priori* s-a acordat atenție deosebită bacteriilor sulfat-reducătoare, izolate frecvent de la adâncimi de peste 1000 m, unde se pot dezvolta bine în formațiunile purtătoare de țiței.

Teoria depolarizării catodice explică fenomenele de coroziune a fierului și oțelului menținute în solul umed sau în contact cu ape poluate cu substanțe organice. Coroziunea este asociată cu apariția unui produs de culoare neagră, atașat lax de metal (grafitizare). După îndepărtarea lui, rămâne vizibil metalul lucios.

În medii umede, elementele catodice ale Fe sunt polarizate de H, în absența O_2. Bacteriile sulfat-reducătoare *(Desulfovibrio, Desulfotomaculum)*, care au hidrogenaze și folosesc H_2 catodic. Ele acționează în reacția normală de depolarizare ca un substituient al O_2, oxidând H catodic.

Produșii de coroziune sunt FeS și $Fe(OH)_2$, după reacțiile:

(1) $4\ Fe \rightarrow 4\ Fe^{2+} + 8\ e^-$ (soluție anodică)

(2) $8\ H_2O \rightarrow 8\ H^+ + 8\ (OH)^-$

(3) $8\ H^+ + 8\ e^- \rightarrow 8\ H$ (reacție catodică)

(4) $H_2SO_4 + 8\ H \rightarrow H_2S + 4\ H_2O$ (depolarizare catodică prin oxidarea H de către bacteriile sulfat-reducătoare)

(5) $Fe^{2+} + H_2S \rightarrow FeS$ (produs de coroziune)

(6) $3\ Fe^{2+} + 6\ (OH)^- \rightarrow 3\ Fe(OH)_2$ (produs de coroziune)

Reacția globală:

$4\ Fe + H_2SO_4 + 4\ H_2O \rightarrow FeS + 3\ Fe(OH)_2 + 2\ (OH)^- + H_2$

Depolarizarea catodică este realizată numai de bacteriile cu activitate hidrogenazică. Reacția cheie a coroziunii catodice este a patra, a reducerii sulfatului cu H. Prin acest mecanism, bacteriile intră direct într-o serie de reacții la suprafața substratului metalic, fie pentru a iniția, fie pentru a accelera o reacție potențială.

În bazinele de păstrare a țițeiului, coroziunea este mai amplă pe fața internă și la bază unde se acumulează substanțe organice necesare microorganismelor. O conductă de oțel groasă de 1 cm poate fi corodată în circa patru ani.

Fenomenele de coroziune pot fi produse pe alte căi: producerea de acizi organici; producerea H_2S (foarte coroziv) de către bacterii, prin descompunerea compușilor organici ai sulfului; formarea S elementar prin reducerea sulfatului în anaerobie; producerea NH_3 din degradarea proteinelor.

Producerea aerării diferențiale sub acțiunea biomasei bacteriene și a precipitatelor de hidroxid feric. Creșterea bacteriilor aderente de suprafața metalelor are drept consecință distribuția neuniformă a concentrației O_2. Aerobele creează anaerobioza, consumând O_2 și apar diferențe de aerare față de zonele în care aprovizionarea cu O_2 rămâne nemodificată. Regiunile anaerobe devin anodice în raport cu cele aerobe și, în consecință, vor deveni centre de pierdere a metalului prin coroziune.

Fenomenul a fost descris ca tipic pentru bacteria *Gallionella ferruginea*, care oxidează Fe feros la Fe feric, producând precipitarea hidroxizilor ferici. Aceștia pot forma pe suprafața internă a conductelor, excrescențe tari numite "tuberculi", legate ferm de suprafața metalului. Ca urmare, în regiunile situate la marginea depozitului, concentrația oxigenului este mai mare, în timp ce zonele de la bază protejează suprafața conductei de contactul cu oxigenul dizolvat în apă.

În consecință, suprafața acoperită de tuberculi devine anodică în raport cu regiunile suprafeței interne a conductei neacoperite de depozitele de bacterii și precipitate de Fe, care sunt

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

catodice. Zonele anodice devin sediul unor fenomene de corodare foarte intensă, care perforează conductele. În zona bazală, anaerobă a "tuberculilor", cresc frecvent bacterii sulfat-reducătoare, care accentuează fenomenul coroziunii.

Coroziunea oxidativă (coroziunea "acidă")

Coroziunea oxidativă are ca substrat producerea de metaboliţi corozivi (acizi minerali sau organici), respectiv a unui exces de H^+ şi se realizează în condiţii naturale, cel mai adesea prin acţiunea asociată a bacteriilor *Thiobacillus* sp. şi *Th. ferooxidans*.

Primele obţin energia prin oxidarea S^0, a tiosulfaţilor şi a tetrationatului, cu producerea H_2SO_4, după reacţiile:

T. thiooxidans: $2\ S^0 + 3\ O_2 + 2\ H_2O \rightarrow 2\ H_2SO_4$

T. thioparus: $Na_2S_2O_3 + 2\ O_2 + H_2O \rightarrow Na_2SO_4 + H_2SO_4$

$2\ Na_2S_4O_6 + 7\ O_2 + 6\ H_2O \rightarrow 2\ Na_2SO_4 + 6\ H_2SO_4$

În culturi pure, *in vitro*, prin aceste reacţii, pH-ul scade la 0,6.

T. ferooxidans oxidează depozitele de pirită şi obţine energie din reacţia:

$$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-$$

Fe feric rezultat oxidează compuşii sulfului la H_2SO_4, după reacţia:

$$2\ FeS_2 + 2\ H_2O + 7\ O_2 \rightarrow 2\ FeSO_4 + 2\ H_2SO_4$$

Aceste reacţii explică acidifierea apelor de drenare din minele de cărbuni şi corodarea severă a instalaţiilor.

Biosolubilizarea metalelor. "Leşierea" bacteriană

Procedeele de biosolubilizare sunt reunite sub denumirea de *leşiere* (engl. *Leaching*, de la "to leach" = a extrage; fr. "lixiviation" de la l. "lixivium" = leşie). Termenul caracterizează ansamblul procedeelor tehnice şi tehnologice, care duc la eliberarea metalelor din zăcăminte sau din depozitele de steril. Ele includ: sfărâmarea minereului, extracţia şi selecţia unei anumite categorii de minerale şi de concentrate, solubilizarea propriu-zisă realizată de bacterii sau de metaboliţii lor şi extracţia metalelor din soluţie.

Procedeele se încadrează în preocupările cunoscute sub denumirea de *hidrometalurgie microbiană* (Brierley, 1986).

Rolul bacteriilor în acest proces a fost sugerat de Colmer şi Hinkle (1947), care au remarcat prezenţa constantă a bacteriei *Thiobacillus ferooxidans*, în apele de drenaj ale minelor de cărbune. Această bacterie, în asociere cu *T. thiooxidans* "dizolvă" metalele din zăcăminte.

Microorganismele care produc leşierea metalelor sunt, în special, chemolitotrofe, acidofile. Au fost implicate *T. ferooxidans*, *T. thiooxidans*, *Leptospirillum ferooxidans*, şi *Sulfolobus acidocaldarius*.

T. ferooxidans are rol fundamental în procesele de biosolubilizare. Se izolează curent din apele acide ale minelor de cărbune şi are rolul de a converti Fe^{2+} la Fe^{3+}. În plus, oxidează compuşii sulfului, cu diferite grade de oxidare: sulfurile (S^{2-}), solubile şi insolubile, sulful nativ (S^0), tiosulfatul ($S_2O_3^{2-}$) sau tetrationatul ($S_4O_6^{2-}$). Produsul oxidării este sulfatul.

Oxidarea Fe^{2+} şi a S^0 se pot realiza spontan, fără intervenţia bacteriilor, sub acţiunea O_2 în aer, dar procesul este lent şi lipsit de semnificaţie practică. Reacţia este accelerată de 200 000-500 000 ori în prezenţa bacteriei *T. ferooxidans*.

Mecanismele biosolubilizării. În procesul de solubilizare a metalelor din zăcăminte, bacteriile pot acţiona pe două căi:

- pe cale *directă*, respectiv prin oxidarea mineralelor sulfurate;
- pe cale *indirectă*, participând la oxidare prin producerea Fe^{3+} şi a acidului sulfuric.

Biosolubilizarea *indirectă* este procedeul prin care metalele sunt eliberate din mineralele insolubile, prin intermediul oxidanţilor chimici produşi de microorganisme. Reacţiile chimice

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

caracteristice leşierii indirecte se pot produce şi ca oxidări pur chimice, dar activitatea microorganismelor accelerează mult viteza reacţiilor chimice.

În leşierea indirectă, bacteriile produc Fe feric (Fe^{3+}) ca $Fe_2(SO_4)_3$ prin oxidarea Fe feros (Fe^{2+}) solubil. $Fe_2(SO_4)_3$ este un oxidant puternic şi dizolvă o mare varietate de metale pe care le transformă în ioni oxidanţi solubili într-o soluţie de acid sulfuric.

Leşierea produsă sub acţiunea $Fe_2(SO_4)_3$ este numită indirectă, deoarece are loc în absenţa bacteriilor viabile, ca şi în absenţa oxigenului. În cursul acestei reacţii, reapare Fe feros, care este rapid reoxidat de bacterii. De aceea, leşierea indirectă se numeşte leşiere "asistată".

În acest proces, intervenţia bacteriei *T. ferooxidans* măreşte viteza reacţiei de oxidare de peste 1 000 000 ori.

Reacţiile de oxidare "asistată" a piritei (FeS_2) sunt următoarele:

$$2FeS_2 + 7O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{bacterii}} 2FeSO_4 + 2H_2SO_4$$

$$FeS_2 + Fe_2(SO_4)_3 \xrightarrow{\text{r. chimică}} 3FeSO_4 + 2S^\circ$$

$$4FeSO_4 + O_2 + 2H_2SO_4 \xrightarrow{\text{bacterii}} 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2O$$

$$2S^\circ + 3O_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{r. chimică}} 2H_2SO_4$$

Biosolubilizarea directă se realizează fără participarea sulfatului feros produs pe cale bacteriană, deoarece metalele sunt eliberate din minereul insolubil direct, prin metabolismul oxidativ al microorganismelor. Bacteriile se leagă fizic pe suprafaţa sulfurilor metalice şi transferă în cursul metabolismului lor energetic, electronii de la Fe sau S, pe atomii de oxigen. Existenţa acestui mecanism aerob a fost demonstrată la *T. thiooxidans*. Consecinţa este solubilizarea metalului, după reacţia:

SM (sulfură metalică) + $2O_2$ → MSO_4 M este un metal bivalent.

Degradarea microbiană a substanţelor xenobiotice

Capacitatea microorganismelor de a degrada mai mult sau mai puţin uşor diferitele molecule complexe existente în natură, este recunoscută fără echivoc. În acest sens pledează imposibilitatea acumulării în mediu, chiar a materialelor greu degradabile şi reînnoibile anual (celuloză, hemiceluloze, lignină etc) precum şi rolul esenţial al microorganismelor în circulaţia elementelor biogene în natură. Atunci, s-a realizat (cazul combustibililor fosili), acumularea s-a produs numai în condiţii de mediu nefavorabile pentru biodegradare.

Aceste observaţii au dus la formularea *principiului infailibilităţii microorganismelor,* conform căruia, orice substanţă este degradată de un microorganism sau de un grup de microorganisme, în condiţii favorabile de mediu.

Substanţele organice cu diferite grade de complexitate, utilizate în agricultură ca pesticide, precum şi în industrie, medicină etc. au infirmat această doctrină, evidenţiind caracterul refractar la degradarea microbiană, a substanţelor diferite chimic de cele obişnuite ale sistemelor biologice.

Substanţele *xenobiotice* (străine de sistemele biologice) sunt substanţe chimice organice sintetice, care sunt introduse în ecosistemele naturale, fie în mod deliberat, fie accidental. Fiind, în general, rezistente la biodegradare se pot acumula în concentraţii care depăşesc anumite limite de toleranţă, determinând efecte negative asupra organismelor vii datorită persistenţei şi concentrării lor, precum şi dificultăţii de a fi introduse în circuitul global al elementelor biogene.

În anii '8o, producţia anuală a celor peste 5 milioane de compuşi chimici era de 300 milioane t/an. Unii sunt biodegradabili, dar cei mai mulţi sunt "recalcitranţi".

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Clasificarea substanţelor xenobiotice cu caracter de poluanţi ai mediului înconjurător

Pe baza compoziţiei chimice, substanţele xenobiotice poluante sunt grupate în trei categorii majore: 1) compuşii organoclorurați; 2) alchil benzen-sulfonați; 3) compuşii organo-fosforici.

Compuşii organoclorurați (sau organohalogenați, deoarece unii pot conţine şi atomi de fluor) reprezintă grupul cel mai numeros şi au grade diferite de rezistenţă la degradare. Grupul cuprinde molecule obţinute prin adiţia de clor sau fluor la unele hidrocarburi alifatice, aromatice sau heterociclice.

Legătura C-Cl sau C-F este foarte stabilă şi necesită consum de energie pentru clivare. Ea conferă stabilitate chimică şi biologică, dar agravează efectul poluant deoarece asigură o persistenţă îndelungată în mediu.

Compuşii organoclorurați au utilizări multiple în agricultură, medicină şi în industrie.

a) *Substanţele insecticide* sunt reprezentate de :

- DDT (4,4-diclorfenil-tricloretan);
- Lindan, izomer al hexaclorciclohexanului (HCH);
- Derivaţi ai ciclopentadienului (aldrin, dieldrin, heptaclor);

b) *Bifenilii policloruraţi* (BPC) sunt amestecuri de bifenil, având 1-10 atomi de clor per moleculă. Au o mare stabilitate biologică, proporţională cu creşterea gradului de clorinare. Sunt substanţe uleioase, folosite ca izolatori sau cu rol de răcire în sistemele electrice închise (transformatori, condensatori), lichide hidraulice şi de transfer de căldură, ignifugare, în industria lacurilor şi vopselelor, a cernelurilor tipografice, ca ulei de imersie pentru microscopie etc.

Dioxinele, prezente în circa 60 de formule chimice. Reprezentanţii tipici sunt 2,3,7,8-tetraclor-dibenzo-dioxina şi 2,3,7,8-tetraclor-dibenzo-furanul. Sunt rezistente la degradare şi au efecte toxice pentru om în concentraţii foarte mici.

c) *Freonii* sunt hidrocarburi alifatice cu g.m. mică, respectiv alcani C_1 - C_2, în care toţi sau aproape toţi atomii de H sunt înlocuiţi de combinaţii F-Cl. Cei mai cunoscuţi sunt freonii F-11 (CCl_3F), F-12 (CCl_2F_2) şi furanul-114 (CF_2Cl-CF_2Cl).

Sunt gaze inerte, foarte volatile, utilizate ca solvenţi sau ca propulsori pentru dispozitive de spray în cosmetică, vopsele, insecticide, precum şi în sisteme de răcire (frigidere, aparate de condiţionare a aerului). Freonii sunt fotolizaţi în atmosferă, unde sunt eliminaţi în cantităţi de circa 10^6 tone/an şi sunt incriminaţi în distrugerea parţială a stratului de ozon, consecinţa fiind creşterea iradierii UV.

d) *Polimerii sintetici*, de tip polietilenă, clorură de vinil, polistiren sunt foarte răspândiţi datorită utilizărilor multiple. Rezistenţa la degradare pare să fie asociată cu greutatea moleculară mare. Polietilena pare să aibă o rezistenţă indefinită la biodegradare.

2) *Alchil-benzen-sulfonaţii* (ABS) sunt componenţi majori ai detergenţilor anionici, datorită capacităţii lor de surfactanţi. Sunt complexe organice cu molecule amfipatice, a căror activitate de suprafaţă are ca efect "înmuierea", desorbţia, emulsionarea, suspendarea şi stabilizarea particulelor dislocate de pe o suprafaţă. Rezultatul acestor efecte este detergenţa sau curăţirea.

Molecula este asimetrică, cu extremitate alchil hidrofobă (lipofilă) şi una sulfonat, hidrofilă. Agentul tensioactiv aflat în soluţia apoasă, vine în contact cu o suprafaţă lipidică. Moleculele lui se orientează astfel încât grupările hidrofobe (alchil) se adsorb la stratul lipidic, iar cele hidrofile, polare (sulfonat), se orientează spre apă. Se creează astfel un monostrat de adsorbţie care face legătura între cele două medii insolubile, apa şi lipidele determinând efectul de "înmuiere".

Sunt rezistenţi la degradare şi produc spumă la suprafaţa apelor poluate.

Efectele ecologice ale substanţelor xenobiotice

Substanţele xenobiotice pot polua toate mediile naturale majore: atmosfera, litosfera şi hidrosfera.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Există două modalităţi de poluare chimică (Reinicke, 1988):

1) *Poluarea localizată,* realizată pe zone mici de efluenţi industriali, accidente de transport sau de utilizare şi în care poluantul poate fi eliminat la concentraţii relativ mari.

2) *Poluarea dispersată* realizată la concentraţie mică, pe suprafeţe mai extinse, rezultând din volatizare, practici agricole.

Efectele poluante sunt agravate de marea diversitate chimică a pesticidelor.

Unele pesticide pot fi degradate în mediu, dar altele sunt rezistente la degradarea sub acţiunea microorganismelor şi pot persista timp îndelungat. Clarke (1980) propune gruparea lor în patru categorii: 1) nepersistente, cu un timp de jumătăţire de 2 săptămâni; 2) slab persistente (cu un timp de jumătăţire de 0,5-1,5 luni); 3) moderat persistente (cu timpul de jumătăţire de 1,5-6 luni); 4) persistente (timpul de jumătăţire mai mare de 6 luni).

Conceptul de *molecule recalcitrante* a fost formulat de Alexander (1965) pentru a caracteriza substanţele care pot persista perioade delungate în natură, fiind refractare la degradare sau sunt mineralizate foarte lent. Iniţial, termenul s-a referit la polimerii din ambalaje şi la agenţii surfactanţi de tipul alchil-benzen-sulfonat înalt ramificaţi, incluşi în formula unor detergenţi. Particularitatea de rezistenţă la degradare nu este limitată exclusiv la substanţele de sinteză chimică, deoarece substanţele poliaromatice şi unii constituienţi humici au un timp de înjumătăţire, apreciat cu radiocarbon, lung de câteva mii de ani.

Alte materiale de origine biologică (lignine, taninuri, melanine, etc) şi unele materiale paleobiochimice, prezintă grade importante de "recalcitranţă": piele tăbăcită, lemn din turbării, spori fungici, aminoacizi legaţi (din sedimente), chitina din fosile etc.

Degradarea compuşilor xenobiotici

Termenul de biodegradare este folosit cu o mare doză de ambiguitate deoarece semnifică orice transformare care are ca rezultat obţinerea unui produs cu o moleculă mai mică decât cea originală. In cazul substanţelor xenobiotice, situaţia este mai complicată deoarece "degradarea" poate duce la apariţia unor produşi noi, refractari şi toxici (uneori chiar mai toxici decât produsul original) sau cu efect oncogen. Un exemplu tipic este al DDT-ului, convertit la un produs final (DBP), încă recalcitrant şi biologic activ (Wedemeyer, 1976).

Substanţele xenobiotice sunt degradate prin două mecanisme majore: mineralizarea şi co-metabolismul.

Mineralizarea, mecanismul cel mai avantajos pentru protecţia mediului natural, este consecinţa unui proces de biodegradare completă. Pentru moleculele xenobiotice halogenate, ea implică conversia scheletului de carbon al acestora la intermediari de metabolism şi, în final, revenirea substanţelor organice halogenate la starea minerală (Reineke, 1988).

Mineralizarea este condiţionată de:

1) pătrunderea substanţelor străine în celule;

2) existenţa unor sisteme enzimatice degradative;

3) existenţa unor mecanisme de reglare susceptibile să fie activate la nevoie.

Procesul de mineralizare permite degradarea pesticidelor, de regulă pe durata unui anotimp şi are următoarele caracteristici:

1) secvenţele enzimatice sunt caracteristice metabolismului microorganismelor şi în final convertesc substanţele organice la substanţe anorganice;

2) o parte din carbonul substratului iniţial este convertit la constituienţi celulari, astfel că mineralizarea este asociată cu creşterea numărului şi a biomasei celulare;

3) este asociată cel mai adesea cu detoxifierea. Dacă unul din produşii intermediari este toxic, el poate exercita efecte nocive asupra mediului, dar, în general, aceştia au viaţă scurtă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Co-metabolismul

Numeroşi compuşi xenobiotici, în special pesticidele organo-clorurate, nu pot fi folosite de microorganisme ca unică sursă de C şi energie şi, ca urmare, nu pot fi îndepărtate din mediu. Ele pot fi însă modificate pe cale biologică, în natură, prin acţiunea unor populaţii mixte de microorganisme.

În cultură pură, nici un organism nu poate folosi substratul respectiv pentru creştere, dar prezenţa unei surse alternative de C şi energie îl poate modifica, transformându-l chimic, încât, adeseori, poate fi utilizat în continuare de alte microorganisme.

Methilomonas methanica utilizează pentru creştere metanul şi realizează concomitent, un proces de oxidare a altor cosubstraturi, ca de exemplu, etanul la acid acetic, propanul la acid propanoic şi acetonă, butanul la acid butanoic şi metilacetonă, etc. Bacteria metanotrofă utilizează pentru creştere numai substratul C_1 caracteristic tipului său de nutriţie, dar nu poate utiliza ca unică sursă de C şi energie nici cosubstraturile enumerate şi nici produşii oxidării lor.

Procesul prin care o bacterie oxidează o substanţă fără să fie capabilă să o utilizeze ca sursă de C şi energie pentru creştere a fost numit *co-oxidare* (Foster, 1962). Ulterior, Jensen (1963) a propus termenul de *co-metabolism* pentru a include şi alte reacţii (dehalogenări, etc) şi pentru a evidenţia necesitatea prezenţei concomitente a unui substrat menit să asigure creşterea.

Conceptul de *co-metabolism* a fost redefinit (Skryabin, 1978) pentru a caracteriza procesul de transformare a unui substrat, care nu permite creşterea unui microorganism în prezenţa unui substrat de creştere sau a altui compus transformabil.

În acest context, degradarea unor compuşi organici rezistenţi la atacul unui microorganism, devine posibilă dacă sistemul substrat-mediu-microorganism este suplimentat cu unul sau mai multe substraturi, utilizabile de către microorganismul respectiv.

Procesele de co-metabolism au următoarele caracteristici majore:

1) au loc numai în medii naturale (apă, sol);

2) nu se poate izola niciodată un singur microorganism capabil să utilizeze substanţele xenobiotice în mod eficient ca sursă de C şi energie;

3) populaţia răspunzătoare de degradare nu creşte ca număr sau ca biomasă după introducerea substratului în apă sau sol. Explicaţia este că populaţiile de microorganisme care fac co-metabolism sunt mici, degradarea compuşilor xenobiotici este lentă şi rata multiplicării lor nu creşte în timp, cum este cazul microorganismelor care metabolizează diferite substraturi până la mineralizare;

4) produşii rezultaţi din co-metabolism sunt lipsiţi, de cele mai multe ori, de orice funcţie metabolică, dacă nu sunt atacaţi în continuare de alte enzime aparţinând catabolismului. De aceea, o particularitate frecventă a co-metabolismului, este acumularea în mediu a compuşilor intermediari, care nu mai pot fi metabolizaţi.

Procesul de co-metabolism este activ pentru degradarea unor pesticide comune (DDT, 2,5 T, aldrin, heptaclor) şi a multor molecule clorinate şi neclorinate (Clarke, 1980).

Procesele de co-metabolism în natură

Importanţa co-metabolismului în natură este demonstrată experimental şi argumentată de observaţii. Astfel, degradarea ligninei la CO_2 sub acţiunea fungilor putregaiului alb *(Phanerochaete chrysosporium* şi *Coriolus versicolor),* necesită prezenţa unui substrat de creştere ca glucoza sau celuloza. Cantitatea de lignină degradată, depinde de cantitatea de substrat de creştere adiţional, iar creşterea fungilor pe lignină, ca unică sursă de C şi energie este neînsemnată.

În sol, prezenţa unei game largi de substanţe organice excretate de rădăcinile plantelor, în special în rizosferă, creează condiţii favorabile pentru co-metabolismul substanţelor refractare la degradare, în special xenobiotice. După Skryabyn (1978), rolul primordial al substratului adiţional, ca sursă de C asimilabil, necesar pentru a realiza co-metabolismul, este de a furniza energie, cofactori sau alţi metaboliţi necesari pentru transformarea substratului recalcitrant.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Co-metabolismul substanţelor xenobiotice în ecosistemele naturale are loc cu o rată scăzută, permiţând acumularea intermediarilor nemetabolizabili, iar în unele cazuri, chiar a unor compuşi mai toxici decât cei iniţiali (Alexander, 1981).

Este greu de apreciat în ce măsură degradarea moleculelor complexe şi a celor xenobiotice revine metabolismului şi respectiv co-metabolismului, dar este evident că multe dintre cele care nu permit creşterea nici unui organism individual sunt degradabile în prezenţa unor populaţii complexe.

In natură, substanţele xenobiotice sunt degradate de circa 50 de genuri de microorganisme (bacterii şi microfungi). Metabolizarea anaerobă a DDT la DDD, precum şi a altor poluanţi (lindan, heptaclor şi posibil aldrin) este realizată de *E. coli, Aerobacter aerogenes, K. pneumoniae,* de unele actinomicete şi levuri, dar şi de organisme fitoplanctonice.

Algele *Chlorella vulgaris* şi *Chlamydomonas reinhardtii* metabolizează lindanul, prin declorinare la pentaclor. Parationul şi pentaclorfenolul sunt degradate rapid în natură, sub acţiunea microorganismelor. *Aspergillus fumigatus, Fusarium roseum* şi *Tricoderma* degradează triazinele (atrazin, simazin).

Reacţiile chimice sunt complexe, puţin cunoscute şi includ dehalogenări, dezaminări, decarboxilări, metiloxidări, β-oxidări, hidroxilări, reacţii de oxidare a azotului sau a sulfului, reducerea oxizilor de sulf, reducerea unor duble sau triple legături etc.

De menţionat că nu toate reacţiile catalizate de microorganisme sunt degradative. Unele produc doar modificarea limitată a moleculelor sau a intermediarilor, cu apariţia unor derivaţi prin nitratare, acilare, dimerizare, formarea de heterocicluri azotate etc. (Burn, 1980).

După Knackmuss (1981), degradarea xenobioticelor în natură este rezultatul acţiunii fortuite a enzimelor peexistente ale catabolismului produşilor naturali. Enzimele destinate acţiunii asupra unor constituienţi naturali din mediu, reacţionează cu unele grupări funcţionale analoge structural, din compoziţia moleculelor xenobiotice. De exemplu, erbicidul sintetic 2,4-D(acid 2,4-diclor-fenoxiacetic) se aseamănă structural cu o serie de compuşi aromatici naturali şi poate fi degradat în sol de *Achromobacter, Arthrobacter, Flavobacterium peregrinum, Pseudomonas,* etc.

Phanerochaete chrysosporium degradează DDT, lindanul şi alţi produşi cloruraţi la CO_2 şi H_2O, sub acţiunea sistemelor enzimatice extracelulare implicate în mod obişnuit în degradarea ligninei.

În concluzie, mediile naturale contaminate cu substanţe recalcitrante (organoclorurate sau de altă natură) pot fi mai uşor detoxifiate şi epurate dacă li se adaugă un analog structural natural biodegradabil, care stimulează multiplicarea microorganismelor active. Pe această bază, Horvath (1972) a propus ca aplicarea erbicidelor în ecosistemele naturale să se facă simultan cu o "îmbogăţire în analogi".

Bazele genetice ale degradării compuşilor organici halogenaţi

Degradarea substanţelor xenobiotice se poate realiza, teoretic, pe două căi majore:

1) Prin utilizarea echipamentului enzimatic al celulei, în cazul în care substratul nou are un anumit grad de analogie chimică şi structurală cu anumite produse naturale. Limitările cinetice care decurg din utilizarea unui substrat înrudit, dar nu specific, sunt depăşite pe mai multe căi: a) prin supraproducţie de enzime; b) prin producerea de enzime cu specificitate modificată prin mutaţie; c) prin inhibarea sau modificarea controlului riguros asigurat de genele reglatoare;

2) Prin activităţi enzimatice noi, codificate de genele preexistente sau de gene heterologe, în urma unor rearanjări şi recombinări genetice "legitime" sau "nelegitime" şi în special prin aport de gene noi de origine plasmidială.

Bazele genetice ale substanţelor xenobiotice sunt puţin cunoscute. Pentru puţinele cazuri studiate, genele sunt cel mai adesea situate grupat, în structura unor plasmide sau transpozoni, o formă mai uşor transmisibilă de la un genom la altul, intra- sau intercelular. Datorită structurilor genetice transmisibile, microorganismele din mediile naturale au dobândit capacitatea de a degrada numeroşi compuşi halogenaţi, în special pe cei cu puţini atomi de halogeni.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tulpinile de microorganisme din mediile naturale (sol, apă, etc) ar fi caracterizate printr-o accentuată *flexibilitate a informației genetice*, ceea ce le-ar asigura o adaptabilitate rapidă, ca răspuns la variabilitatea substratelor din medii. Ele s-ar deosebi de tulpinile bacteriene utilizate curent în studiile de genetică bacteriană *(E. coli, S. typhymurium)*, limitate la un habitat unic (intestinul), lipsite de versatilitate catabolică și supuse unor controale foarte riguroase.

Tulpinile bacteriene saprobionte în mediile naturale, confruntate permanent cu o gamă largă de nutrienți și de condiții de mediu, ar reprezenta un potențial de evoluție biochimică mai rapidă, în special catabolică, ceea ce le-ar permite să degradeze compuși chimici sintetici, fără echivalent în natură.

Cauzele rezistenței la degradare. Perspectiva obținerii și utilizării unor pesticide noi este condiționată de calitatea de biodegradabilitate și de cunoașterea mecanismelor care determină caracterul de moleculă recalcitrantă.

1) *Biodegradarea este condiționată* de pătrunderea substanței în celulă, aceasta fiind determinată de mărimea moleculei. Moleculele organice prea mari sau prea complexe și insolubile trebuie mai intâi să fie degradate la compuși mai mici, care pot fi internalizați și utilizați intracelular în catabolism. Degradarea inițială este rezultatul acțiunii enzimelor extracelulare. Rezitența cvasiabsolută a polietilenei este determinată de greutatea moleculară mare și de absența enzimelor extracelulare capabile să o fragmenteze.

2) *Structura moleculară* pare să aibă un rol esențial: modificări chimice minore pot transforma un substrat biodegradabil într-unul recalcitrant. De exemplu, erbicidul 2,4-D (acidul 2,4-diclorfenoxiacetic) este degradabil în sol în câteva zile, în timp ce 2,4,5-D (acidul 2,4,5-triclorfenoxiacetic), care diferă printr-un singur atom de Cl; rezistă câteva luni. Polietilena (polimer sintetic - $(CH_2CH_2)_n$ este refractară la atacul microorgansimelor, dar polietilenglicolul $(CH_2CH_2O)_n$ este degradat.

Relația directă dintre structura moleculară și gradul de biodegrabilitate, este ilustrată de diferența de rezistență la degradare a celulozei și ligninei. Celulazele clivează în mod repetat același tip de legătură chimică între subunități identice ale celulozei. Chiar în cazul proteinelor, legăturile peptidice succesive sunt identice, deși leagă aminoacizi diferiți.

Situația este diferită în cazul ligninei și humusului. Ele sunt mineralizate lent, deoarece sunt alcătuite din molecule și legături diferite între blocurile de construcție.

3) *Absența echipamentului enzimatic necesar pentru biodegradare.* Spre deosebire de biopolimeri, care sunt degradați mai mult sau mai puțin lent, substanțele xenobiotice sunt frecvent refractare la biodegradare din cauza absenței enzimelor active asupra structurii lor. Compușii xenobiotici având structuri chimice foarte variate și adesea complexe, au apărut într-un timp scurt și conțin grupări chimice, în general nerecunoscute de enzimele microbiene. Cei care prezintă anumite grade de asemănare cu compușii naturali, pot fi degradați mai mult sau mai puțin lent. Degradarea compușilor xenobiotici necesită modificări structurale extensive înainte de a intra în căile centrale ale metabolismului bacterian. În consecință, vor fi parțial sau total rezistente la degradare și se vor acumula în mediu (Janke și Fritsche, 1985).

Incapacitatea poluanților de a induce sinteza enzimelor degradative

Concentrația prea mică a poluantului (ppm, ppb) este insuficientă pentru a induce enzimele necesare degradării. Biodegradarea compușilor sintetici are loc numai în nișele ecologice în care concentrația lor este suficient de mare pentru a exercita funcția de presiune în selecție.

Rezistența la biodegradare a unor poluanți, poate fi determinată de adsorbția lor pe diferite substraturi din sol și sedimente. Adsorbția poate masca situsul substratului la care se leagă enzima și astfel o moleculă biodegradabilă devine refractară.

Caracterul recalcitrant al unei substanțe xenobiotice nu este totdeauna intrinsec, ci este uneori, determinat de factori de mediu: a) absența oxigenului în cazul substanțelor degradabile numai în aerobioză; b) prezența unor factori (acizi organici, toxine, săruri) inhibitori ai multiplicării microorganismelor active; c) efectul combinat al temperaturii scăzute și al presiunii mari în adâncul mărilor; d) sedimentarea compușilor într-un situs inaccesibil microorganismelor; e) concentrația scăzută a nutrienților care limitează multiplicarea microorganismelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Consecinţe ecologice ale prezenţei substanţelor xenobiotice în natură.

Larga utilizare a pesticidelor în practica agricolă a determinat un caracter global al răspândirii lor sol, în apele interioare şi marine.

Diferite modalităţi de răspândire pot determina efecte nocive la distanţe mari de locul de aplicare. DDT-ul a fost găsit în zăpezile din Antartica, la peste 6 000 km de locul cel mai apropiat de administrare.

Toxicitatea pentru microorganisme. Microorganismele au o mare capacitate de adsorbţie a pesticidelor, în special din mediile acvatice, deşi se găsesc în concentraţii foarte mici, favorizate de 2 factori:

a) suprafaţa mare de contact cu mediul înconjurător;

b) caracterul lipofil al majorităţii pesticidelor şi în special al insecticidelor. Ele au o mare afinitate pentru fosfolipidele din membranele celulare.

Multe pesticide au efecte perturbatoare asupra circuitului azotului, inhibă fotosinteza şi celulozoliza, diminuă randamentul producţiei primare a fitoplanctonului, au efecte toxice asupra zooplanctonului.

Fenomenul de bioacumulare. Datorită solubilităţii lor reduse în apă, pesticidele au tendinţa de a se localiza în interiorul celulelor vii. Ca urmare, microorganismele, fitoplanctonul şi plantele macrofite, precum şi fauna de toate dimensiunile pot acumula şi stoca în celulele şi ţesuturile lor, cantităţi importante de pesticide, în concentraţii inverse faţă de solubilitatea lor în apă.

Procesul de bioacumulare ("Biomagnification") este agravat de faptul că, după concentrare, acestea nu sunt nici degradate şi nici excretate în cantităţi semnificative, ci sunt introduse şi transmise ca atare în reţeaua trofică. Astfel, procesul de concentrare continuă de-a lungul diferitelor verigi ale lanţului trofic, teoretic cu circa 1 ordin de mărime pentru fiecare nivel trofic succesiv. Afirmaţia are la bază observaţia că din biomasa utilizată la un anumit nivel trofic, numai 10-15% este transferată la nivelul trofic superior, restul de 85-90% fiind disipată în cursul activităţilor metabolice prin respiraţie. În consecinţă, la nivelul trofic cel mai înalt (animale prădătoare), poluantul poate fi prezent în ţesuturi, la concentraţii care depăşesc de 10^4-10^6 ori şi cazuri extreme de $2{,}5 \times 10^6$ ori concentraţia sa în mediul natural.

Măsurarea concentraţiei DDT-ului la toate verigile lanţului trofic, ilustrează un principiu general al poluării în sensul că, cu cât un organism este mai sus în piramida trofică, cu atât poluantul este mai concentrat în ţesuturile sale. Dacă producătorii primari concentrează poluantul în concentraţii mai mari decât în mediu şi fiecare nivel trofic succesiv îl concentrează peste nivelul existent în hrana sa, devine evident că un erbivor poate acumula mai mult poluant decât plantele pe care le consumă, iar un carnivor de la vârful piramidei trofice acumulează o cantitate şi mai mare. În felul acesta, unele molecule recalcitrante, netoxice la concentraţii existente în natură devin toxice prin acumulare în concentraţii mari în ţesuturi, determinând efecte negative asupra speciilor situate la sau aproape de vârful lanţului trofic.

Fenomenul de bioacumulare are un caracter universal în natură, deoarece la fiecare nivel trofic există organisme "concentratoare". Restrângerea biomasei la nivelele trofice superioare este asociată cu acumularea de substanţe recalcitrante.

Aplicaţii practice. Biodegradarea şi îndepărtarea poluanţilor recalcitranţi, respectiv detoxifierea şi mineralizarea lor de către microorganisme, reprezintă un factor esenţial în încercarea de a atenua efectele lor ecologice. Procedeele menite să realizeze acest obiectiv sunt:

- producerea unor pesticide mai uşor degradabile, prin includerea în structura lor, a unor grupări chimice cu echivalenţe naturale sau introducerea unor modificări care le transformă în substraturi nutritive pentru microorganismele din apă şi din sol;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- utilizarea unor teste care să stabilească gradul de biodegrabilitate într-un interval rezonabil, precum şi lipsa de toxicitate şi inocuitatea .

- *construcţia unor tulpini bacteriene* capabile să degradeze substanţele xenobiotice, prin metode genetice (schimbul natural de gene prin cocultivare) şi prin tehnici de inginerie genetică.

Pe baza acestor principii, Knackmuss (1984) a obţinut tulpini de *Pseudomonas* capabile să degradeze o gamă largă de clorbenzoaţi şi clorfenoli. Prin transferul de plasmide, Ghossal (1985) a obţinut o tulpină de *P. cepacia* capabilă să catabolizeze erbicidul 2,4,5-T, deşi nici un microorganism natural nu a realizat această degradare.

Nu se ştie dacă în ecosistemele naturale are loc un schimb similar de gene codificatoare ale enzimelor capabile să degradeze substanţe xenobiotice şi nici dacă transconjuganţii îşi exercită capacităţile degradative faţă de compuşii xenobiotici.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Lucrarea a fost redactată pe baza consultării unui mare număr de articole de sinteză publicate în reviste și a unor cărți și tratate de Microbiologie și Virologie:

Applied Microbiology
Applied and Environmental Microbiology
Archives of Microbiology
J. of Biological Chemistry
Can J. of Microbiology
Clinical Microbiological Reviews
Journal of Bacteriology
J. of Gen Microbiology
J. of Clinical Microbiology
J. of Medical Virology
Journal of Virology
Journal of General Virology
Microbiological Reviews
Microbiological and Molecular Biology Reviews (MMBR)
Nature
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Science
Virology
Scientific American, etc.

Cărți:

ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J. - *Molecular biology of the cell,* 3rd Edition, Garland Publishing, 1994.

BLACK, J. G. - *Microbiology Principles and Applications,* 3rd, Edition, Pretince Hall, Upper Sadle River, 1996.

BROCK Th. - *Biology of microorganisms,* Pretice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1988.

CAJAL N. - *Tratat de Virologie Medicală,* vol. I, Editura Medicală București, 1990.

DAVIS B., DULBECCO R., ELISSEN H. - *Microbiology,* 4th Edition,New York Lippicnott, 1990.

FIELDS B.N., KNIPE D. M. - *Virology*, Second Edition, Raven Press, Ltd., New York, 1990.

FIELDS B. N., KNIPE D., HOWLEY P. M. - *Fields Virology,* 3rd Edition Lippincot - Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

FREIFELDER D. - *Molecular Biology,* second Edition, Jones adn Bartlett Publishers Inc, Boston, 1987.

LEDERBERG J. - *Encyclopedia of Microbiology* Academic Press Inc., 1992.

LEHNINGER A. L. - *Biochimie,* vol. I, Traducere după ediția a II-a, Editura Tehnică București, 1975.

LE MINOR LEON, MICHEL V. - *Bacteriologie medicale,* Flamarion Medicine Sciences, 1990.

MIHĂESCU G., GAVRILĂ L. - *Biologia microorganismelor fixatoare de azot*, Editura Ceres, București, 1989.

NESTOR E., PEARSALL N., ROBERTS J., ROBERTS E. - *The Microbial Perspective*, Saunders College Publishing, 1982.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

STANIER R. Y., DOUDOROFF M., ADELBERG E. A. - *The Microbial world,* Prentice Hall Inc., Englewood Clifs, 1970.

STARR M P. şi colab., *The Prokarotes,* Springer Verlag, Berlin, New York, 1981.

STREIPS N. U., YASBIN R. E. - *Modern Microbial Genetics,* Willey - Liss, 1991.

TOPLEY and WILSON'S *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity,* 8th Edition, Ed. M. Tom Parker, Lesslie H. Collier, 1990.

TOPLEY and WILSON'S, *Microbiology and Microbial Infections,* Vol. I, II, Ed. Lesslie Collier, A. Balows, M. Sussman, 1998.

WATSON J. D., HOPKINS E, STEITS W. - *Molecular Biology of the Gene,* The Benjamin Cummings Comp., 1987.

WISTREICH G. A., LECHTMAN M. D. - *Microbiology,* Macmillan Publishing Comp., 1984.

ZARNEA G. - *Microbiologie generală,* Editura Didactică şi pedagogică Bucureşti, 1970.

ZARNEA G. - *Tratat de Microbiologie generală,* volumele I, II, III, V, 1983 - 1994.

VERIFICAT 2017

VERIFICAT 2007

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 608/1999, la
Tipografia Editurii Universităţii din Bucureşti

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITARA „CAROL I"

DE SPIRITU ET ANIMA

DATA RESTITUIRII		
20 IUN. 2014	28 APR. 2014	20 NOV. 2019
20 IUN. 2012	—	
20 IUN. 2012	20 OCT. 2014	
21 IUN. 2012	02 MAR. 2015	
22 IUN. 2012	09 MAI 2015	
23 IUN. 2012	—	
25 IUN. 2012	26 MAR. 2015	
29 IUN. 2012	—	
30 IUN. 2012	22 02 2017	
02 IUL. 2012	—	
—	13 SEP. 2017	
31 MAI 2013	—	

19 IUN. 2012

115.800

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ISBN 973-575-455-X

Lei 115900

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro